HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アディポカイン産生・分泌に関わる腸上皮細胞－脂肪細胞連関の生理学的解析
Author(s)	石原, 利乃
Citation	
Issue Date	2015-06-30
DOI	
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/59789
Right	
Type	theses (doctoral)
Additional Information	
File Information	Rino_Ishihara.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文

アディポカイン産生・分泌に関わる
腸上皮細胞－脂肪細胞連関の生理学的解析

北海道大学大学院生命科学院　生命科学専攻　生命システム科学コース
消化管生理学研究室
博士課程　石原　利乃

目次

略語一覧 ---------- 1

序論 ---------- 2

第一章　腸上皮細胞が脂肪細胞のアディポカイン分泌および遺伝子発現に及ぼす影響
Ⅰ　緒言 ---------- 8
Ⅱ　材料および方法 ---------- 9
Ⅲ　結果 ----------14
Ⅳ　考察 ----------20

第二章　脂肪細胞のアディポカイン分泌を刺激する腸上皮細胞由来因子の検討
Ⅰ　緒言 ----------21
Ⅱ　材料および方法 ----------22
Ⅲ　結果 ----------24
Ⅳ　考察 ----------27

第三章　マウス腸粘膜ホモジネート上清が脂肪細胞のアディポカイン分泌に及ぼす影響
Ⅰ　緒言 ----------29
Ⅱ　材料および方法 ----------30
Ⅲ　結果 ----------33
Ⅳ　考察 ----------35

総括 ----------37

引用文献 ----------39

謝辞 ----------53

略語一覧

ACC	acetyl-CoA carboxylase
Angpt	angiopoietin-like protein
B6	C57BL/6J JmsSlc
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
CM	conditioned medium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
FAS	fatty acid synthase
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
Fiaf	fasting-induced adipose factor
GLP	glucagon-like peptide
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IL	interleukin
KK	KK-Ay/TaJcl
LPL	lipoprotein lipase
MCP	monocyte chemoattractant protein
MIP	macrophage inflammatory proteins
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
PYY	peptide YY
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SGBS	Simpson-Golabi-Behmel syndrome
TEER	transepithelial electrical resistance
TG	triglyceride
TNF	tumor necrosis factor

序論

平成 22 年度人口動態統計結果の概況（厚生労働省）によると、動脈硬化を起因とする虚血性心疾患などの心疾患および脳卒中などの脳血管疾患は、日本人の死因のそれぞれ第2位および3位であり、併せると死因全体の約 3 割を占める。動脈硬化の発症要因の一つに、日本内科学会などにより平成 17 年に提唱されたメタボリックシンドロームという概念がある。これは、内臓脂肪症候群とも呼ばれ、内臓脂肪の蓄積によって糖尿病、高血圧症および脂質異常症が複合的に集積する疾患概念である。さらに、内臓脂肪の蓄積は、正常者の血中インスリン濃度と変わらない場合でも血糖降下がみられないインスリン抵抗性を引き起こすことも知られている（Reaven 1988）。インスリン抵抗性は糖尿病との関与だけでなく、これに引き続いて起こる高インスリン血症、さらには高血圧を招く（Okuno *et al.* 1998、Kubota *et al.* 2003）。また、インスリン抵抗性は、脂質代謝のバランスを破綻させ、脂質異常症を発症することも知られる（Lazar 2006、Kadowaki *et al.* 2006）。これらのことから、インスリン抵抗性もメタボリックシンドロームに大きく関与していることがわかる。肥満（内臓脂肪の蓄積）の予防・改善は、動脈硬化のリスク軽減につながり、虚血性心疾患および脳血管疾患の予防に非常に重要であると言える。わが国では、国民の健康増進運動の一環として健康日本 21（厚生労働省）が推進され、国民一人ひとりのメタボリックシンドロームの認知、該当者および予備群の減少、ならびにメタボリックシンドロームの概念を取り入れた特定健康診査・特定保健指導（厚生労働省）受診の推進活動が行われている。

肥満は、個体のエネルギー不均衡の結果、体脂肪が過剰に蓄積した状態と定義される（杉浦 2003）。脂肪組織には、白色脂肪組織および褐色脂肪組織があるが、肥満は白色脂肪組織の増大に起因すると考えられている（Klyde & Hirsch 1979）。また、白色脂肪組織は、皮下脂肪組織および内臓脂肪組織に大別されるが、前述したように、皮下脂肪組織よりも内臓脂肪組織の脂肪蓄積が、メタボリックシンドロームの発症に関係している。その機序として、内臓脂肪組織が腸間膜など門脈系に近接しているために、脂肪の分解によって生じた遊離脂肪酸およびグリセロールが、門脈へと流入し、直接肝臓に運ばれ、脂肪肝、肝臓におけるインスリン抵抗性、ならびに高血糖をもたらすと考えられている（Itoh *et al.* 2003、Hibuse *et al.* 2006）。肥満を発症したマウスやヒトの白色脂肪組織では、マクロファージが浸潤し、慢性炎症が生じていることが報告された（Xu *et al.* 2003、Weisberg *et al.* 2003）。脂肪組織にマクロファージが浸潤する初期の誘導因子は不明であるが、monocyte chemoattractant protein -1（MCP-1）が、遺伝子発現レベルにおいて他の炎症マーカーよりも早い時期に認められることから（Xu *et al.* 2003）、白色脂肪組織へのマクロファージの浸潤において重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。このことについて Wellen と Hotamisligil（2003）は、以下のような仮説を提唱している。肥満時に肥大化した脂肪細胞から分泌される tumor necrosis factor-α（TNF-α）などの刺激により、白色脂肪組織中の内皮細胞や前駆脂肪細胞が MCP-1 の分泌を増加させ、それによって血液中の単球が白色脂肪組織にリクルートされる。単球から分化したマクロファージは、さらに MCP-1 を分泌して単球を呼び寄せるとともに、TNF-αおよび interleukin-6（IL-6）などの炎症性サイトカインを分泌するというものである。

白色脂肪組織は、白色脂肪細胞、前駆脂肪細胞、血管内皮細胞および線維芽細胞など様々な細胞種が共存して形成されており、その増大は、個々の白色脂肪細胞の肥大化、および細胞数の増加に起因すると考えられている（Hirsch *et al.* 1966）。以下に述べる脂肪細胞は、全て白色脂肪細胞を指す。脂肪細胞は、ヒトにおいて 250～300 億個存在するといわれており、個々の細胞内が一つの大脂肪滴で占められている（単房性）（Sugihara *et al.* 1986）。この脂肪滴の本体は、中性脂肪（triglyceride, TG）である（Sugihara *et al.* 1986）。白色脂肪細胞は、TG の蓄積と分解を絶えず行っている（Sugihara *et al.* 1986）。TG の蓄積は、食餌として摂取された TG が小腸にて消化された後に、小腸上皮細胞内で再び TG として合成され、カイロミクロンとして脂肪組織へと運ばれ、遊離脂肪酸に分解されてから脂肪細胞に吸収され、細胞内 TG として合成されるか、あるいは、摂取された炭水化物由来のグルコースが、脂肪細胞内にて TG に合成されることによって生じる（Reiser *et al.* 1952、Hahn 1943、Frayn 2002、Smith *et al.* 2000）。一方、TG の分解は、空腹時または運動時などエネルギー不足の際に生じ、分解によって生じた遊離脂肪酸およびグリセロールは、血中に放出される（Lee *et al.* 1998）。脂肪細胞の肥大化の原因は、TG の蓄積と分解のバランスが、TG の蓄積側に傾いたためと言える。また、脂肪細胞は、およそ 130 μm まで肥大しうるが、これ以上は肥大せず、出芽および分裂を経て、成熟脂肪細胞の状態で増殖する（Sugihara *et al.* 1987）。

近年、脂肪細胞は、過剰なエネルギーを TG として蓄える貯蔵の場として機能するだけでなく、摂食、糖、脂質およびエネルギーの代謝を調節する内分泌臓器であると認識されている（Matsuzawa 1999）。脂肪細胞由来の生理活性物質を総称してアディポカインとよぶ。以下に代表的なアディポカインの概説を示した。

<u>レプチン</u>

成人後、ヒトの体重は長期にわたりほぼ一定であるが、このことは、体内には、体重を一定に保つ何らかのメカニズムが存在するためであると考えられてきた。また、体重は、エネルギー収支のバランスによって決定されるが、このバランス調節には、視床下部が関与していることが知られていた。しかしながら、エネルギー収支がどのような状態であるのかについて、すなわち、脂肪組織の増減がどのような状態であるのかについて視床下部へと何らかの情報伝達が行われていなければ、視床下部が、エネルギー収支を調節することはできない。1953 年に Kennedy は、脂肪組織から視床下部へと食欲を抑制する情報が伝達されており、体重の増加により脂肪組織から放出されるシグナルの強度が増加し、体重が元に戻るという理論を提唱した（Kennedy 1953）。この脂肪組織由来のシグナルは、長らく不明であったが、1994 年に Friedman らによって同定された、遺伝性肥満である *ob/ob* マウスの肥満の原因遺伝子であるレプチンが（Zhang *et al.* 1994）、その後の研究により、レプチン受容体を介して強力な摂食抑制作用およびエネルギー亢進作用をもたらす脂肪組織由来のシグナルであることが明らかとなった（Campfield *et al.* 1995、Vaisse *et al.* 1996）。レプチンは、167 個のアミノ酸残基からなる約 16 kDa のポリペプチド鎖を生じ、循環血液中において単量体として存在する（Zhang *et al.* 1994）。レプチン遺伝子は、主に脂肪組織に発現しており、特に成熟脂肪細胞に高発現している（Masuzaki *et al.* 1995）。脂肪細胞より分泌されたレプチンは、循環血液によってレプチン受容体へ

と運ばれる（Tartaglia *et al.* 1995）。レプチン受容体には、少なくとも 6 種類のアイソフォームが存在するが（Lee *et al.* 1996、Tartaglia *et al.* 1995）、受容体のアイソフォームの一つである Ob-Rb が欠損している *db/db* マウスが、レプチン欠損マウスである *ob/ob* マウスと同様の表現型となることから、Ob-Rb はレプチンの作用に必須であると考えられている（Halaas *et al.* 1995）。Ob-Rb は、視床下部においてその発現レベルが高いことが知られおり、レプチンの刺激を中枢神経系に神経刺激として伝達している。循環血液中のレプチン濃度はヒト肥満者において上昇し、body mass index および体脂肪量に相関する（Hosoda *et al.* 1996）。したがって、循環血液中のレプチン濃度は体脂肪量およびエネルギー状態の指標になると考えられる。

アディポネクチン

脂肪委縮性糖尿病は、脂肪組織が委縮あるいは欠如しているにもかかわらず、インスリン抵抗性を呈することが知られているが、どのようにして惹起されるのかについては不明なままであった。脂肪委縮性糖尿病モデルマウスに正常マウスの脂肪組織を移植したところ、インスリン抵抗性が完全に改善したことから（Gavrilova *et al.* 2000a）、正常脂肪組織がインスリン感受性ホルモンを分泌していることが想定された。レプチンがインスリン抵抗性を改善する作用があることが報告されたが（Shimomura *et al.* 1999、Gavrilova *et al.* 2000b）、生理的なレプチン濃度の補償では、部分的にしか脂肪委縮性糖尿病のインスリン抵抗性を改善しなかったため、レプチン以外のインスリン感受性ホルモンの存在が示唆されていた。これは、後のアディポネクチンにあたる。1996 年、ヒト脂肪組織の遺伝子網羅解析により脂肪組織特異的に発現する分泌タンパク質として同定されていたものの、その機能については不明なままであった（Maeda *et al.* 1996）。しかし、2001 年に、Yamauchi らによってアディポネクチンが欠乏している脂肪委縮性糖尿病モデルマウスにアディポネクチンを生理的な濃度で補充したところ、インスリン抵抗性、高遊離脂肪酸血症および脂質異常症の改善が観察された（Yamauchi *et al.* 2001）。また、肥満および環境要因によって発症する二型糖尿病のモデルマウスでは、高脂肪食負荷により循環血液中のアディポネクチン濃度は低下し、これに伴ってインスリン抵抗性、高遊離脂肪酸血症および脂質異常症が惹起されるが、生理的な濃度のアディポネクチンを補充することにより、インスリン抵抗性および脂質異常症が改善した（Yamauchi *et al.* 2001）。さらに、循環血液中のアディポネクチン濃度は、インスリン感受性と相関することも報告されている（Lindsay *et al.* 2002）。これらの報告から、アディポネクチンは、インスリン抵抗性改善に非常に有効な因子であるといえる。アディポネクチンは、白色脂肪組織の中でも脂肪細胞特異的に発現しており、脂肪細胞の分化に伴って発現が誘導され、小型脂肪細胞で高く発現しており、一方で肥大化脂肪細胞では転写が抑制される（Kadowaki 2000、Yamauchi *et al.* 2001）。アディポネクチンは、244 個のアミノ酸残基からなる約 30 kDa のポリペプチド鎖を生じる（Maeda *et al.* 1996、Kadowaki & Yamauchi 2005）。ヒトやマウスの血清中では、3 量体、6 量体および高分子量の複合体として存在する分泌タンパクである（Tsao *et al.* 2002、Pajvaniet *et al.* 2003）。肥満およびインスリン抵抗性時には、特に高分子量の複合体が減少することが報告されている（Tsuchida *et al.* 2005）。アディポネクチンは、アディポネクチン受容体を介して作用するが、その受容体は、AdipoR1 および AdipoR2 の 2 種類が同定され

ている（Yamauchi *et al.* 2003）。AdipoR1 は、骨格筋に高発現しており、糖取り込みおよび脂肪燃焼を促進する。一方、AdipoR2 は、肝臓に高発現しており、脂肪燃焼を促進し、糖新生を抑制する（Yamauchi *et al.* 2003）。遺伝性肥満マウスである *ob/ob* マウスの骨格筋および脂肪組織において、AdipoR1 および AdipoR2 の発現が低下し、そのシグナルが減弱するという結果から、AdipoR1 および AdipoR2 の発現調節がアディポネクチンの作用を制御する可能性があることが示唆されている（Tsuchida *et al.* 2004）。

レジスチン

2001 年、気管支の炎症反応部位に誘導されるタンパクとして FIZZ1 が発見された（Holcomb *et al.* 2000）。これと相同性の高いものとして同定されたのが、レジスチンである（Holcomb *et al.* 2000）。循環血液中においてレジスチンは、92 個のアミノ酸残基からなる約 13 kDa のポリペプチド鎖を生じる（Steppan *et al.* 2001a）。ヒトやマウスの血清中では、2 量体、2 量体の重合体、および他のレジスチンファミリーとの複合体として存在する分泌タンパクである（Aruna *et al.* 2003、Banerjee *et al.* 2001、Chen *et al.* 2002、Raghu *et al.* 2004）。レジスチンは、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 において、グルコースの取り込みを阻害すること、マウスに投与した際に耐糖能異常が生じるが、レジスチン抗体により中和することで耐糖能異常が消失すること、インスリン抵抗性改善薬である peroxisome proliferator-activated receptor γ（PPARγ）リガンドによって発現が抑制されることなど報告されている（Moon *et al.* 2003、Steppan *et al.* 2001b、Rangwala *et al.* 2004）。また、マウス循環血液中のレジスチン濃度は、肥満および糖尿病に伴い上昇する（Steppan *et al.* 2001b）。マウスにおけるレジスチンは、脂肪細胞に限局的に発現しており、脂肪細胞の分化によって発現が誘導される（Steppan *et al.* 2001b）。また、肥満関連転写因子である CCAAT/enhancer binding protein α（C/EBPα）、肥満（遺伝および高脂肪食負荷）および高血糖などによってもその発現が上昇することが報告されており（Ghosh *et al.* 2003）、インスリン抵抗性への関与が示唆されている。一方、ヒトにおけるレジスチンは、脂肪細胞にほとんど発現しておらず、主に単球およびマクロファージに発現していることが明らかにされている（Nagaev & Smith 2001、Savage *et al.* 2001、Patel *et al.* 2003）。脂肪組織に浸潤するマクロファージにより分泌されることが示唆されており（Curat *et al.* 2006、Nagaev *et al.* 2006）、アディポカインというよりは、炎症性サイトカインとして作用する可能性がある。また、マウスとヒトでは、アミノ酸レベルの相同性（59%）が比較的低いという報告もあり（Ghosh *et al.* 2003）、病態生理学的にかなりの相違がある可能性がある。

以上のように、脂肪細胞が分泌するアディポカインは、肥満に伴うインスリン抵抗性に関与する非常に重要な因子であると考えられる。そのため、アディポカインの産生と分泌を調節することは、インスリン抵抗性、ひいてはメタボリックシンドロームの予防や改善につながると言える。

ところで、ヒトの腸内には、多種多様な微生物が存在し、腸内細菌叢とよばれている（Hooper & Gordon 2001、Ley *et al.* 2006a、Neish 2009、Blaser & Falkow 2009）。その大部分は嫌気性菌が占め、2000 種類にも及び、少なくとも 10^{14} の細菌によって構成されている（Tilg *et al.* 2009）。また、腸管にお

ける第一線防御機構である腸上皮は、腸内細菌に曝露されており、細菌の認識と寛容により互いが共存している（Cario 2005）。特に、腸上皮細胞は、腸関連のリンパ組織の発達を保護するケモカインの放出や（van Deventer 1997）、toll-like receptor や nod-like receptor による菌体の認識を絶えず行っており（Creagh *et al.* 2006、Kawai & Akira 2007）、自然免疫システムの調節において中心的な役割を果たしている。一方、腸内細菌叢は、宿主の腸管免疫系を発達させること（Slack et al. 2009、Lee & Mazmanian 2010）や、宿主が消化できない食餌由来の難消化性物質を発酵し、宿主のエネルギー獲得を補助することが知られている。

Jeffrey I. Gordon らの研究グループによって、腸内細菌叢と宿主のエネルギー代謝との関連が示された。Bäckhed らは、腸内細菌叢を有する通常飼育マウスの糞から培養した腸内細菌叢を無菌マウスに移植したコンベンショナルマウスでは、無菌マウスと比べて肥満およびインスリン抵抗性が亢進することを示した（Bäckhed *et al.* 2004）。Ley らは、腸内細菌の 16S ribosomal RNA 遺伝子のシークエンス解析結果から、遺伝性肥満を呈する *ob/ob* マウスの腸内細菌叢は、痩身の *ob/+*マウスや野生型マウスと比べて Bacteroidetes 門の存在比が 50%ほど低下し、Firmicutes 門の割合が増加していることを示した（Ley *et al.* 2005）。また、肥満者と痩身者の比較によって、ヒトにおいても動物実験の結果と類似するような腸内細菌叢に差異があることを示した（Ley *et al.* 2006b）。Turnbaugh らは、メタゲノム解析および生化学的解析から、肥満マウスの腸内細菌叢は、痩身マウスの腸内細菌叢と比べて食餌からのエネルギー回収能力が高いことを示した（Turnbaugh *et al.* 2006）。さらに、無菌の野生型マウスに *ob/ob* マウス由来の腸内細菌叢を定着させると、痩身マウス由来の腸内細菌叢を定着させた場合と比べて体脂肪量が増加することを示した（Turnbaugh *et al.* 2006）。同様に、痩身の無菌マウスに食餌誘導性肥満マウス由来の腸内細菌叢を定着させると、痩身マウスの腸内細菌叢を定着させた場合と比べて体脂肪量が増加することも示した（Turnbaugh *et al.* 2008）。これらは、肥満マウスは肥満型の腸内細菌叢を有し、同様に、痩身マウスは痩身型の腸内細菌叢を有しており、腸内細菌叢の移植によりそれらの形質は伝達されることを意味している。さらに、Cani らは、脂肪組織における軽度の炎症に対する腸内細菌叢の関与を報告した。高脂肪食摂取マウスにおいて腸内細菌由来のエンドトキシン/ lipopolysaccharide が体内移行する割合が増加した結果、代謝性エンドトキシン血症を発症し、これが脂肪組織の軽度の炎症およびインスリン抵抗性に寄与するというものである（Cani *et al.* 2007）。したがって、腸内細菌叢は、肥満の発症に重要な役割をもつだけでなく、肥満を背景とした脂肪組織の炎症およびインスリン抵抗性などのメタボリックシンドロームに関与していると考えられる。

腸粘膜の中でも最外層に位置する腸上皮細胞は、腸内細菌叢に直接曝露しているにもかかわらず白色脂肪組織との関係についてはあまり研究されていない。これまでに、コンベンショナルマウスでは、腸上皮細胞のリポタンパクリパーゼ（lipoprotein lipase, LPL）阻害タンパク質である fasting-induced adipose factor（Fiaf）/ angiopoietin-like protein 4（Angpt4）の発現が低下し、白色脂肪組織における LPL 活性が上昇する結果、脂肪細胞の脂肪酸取り込みおよび TG 蓄積が増加することが報告されている（Bäckhed *et al.* 2007）。また、小腸上皮細胞に発現する分泌型 C 型レクチンである RegⅢβは、腸内細菌叢によってその発現が調節され（Iovanna & Dagorn 2005）、RegⅢβ過剰発現マウスでは、

体重の増加および血中グルコース上昇などのメタボリックシンドロームに関するパラメータの破綻をきたす一方、RegⅢβ欠損マウスでは、野生型と比較して体重が減少することが報告された（Secq *et al.* 2014）。少なくともこれらの報告から、腸内細菌叢が肥満に関与する時に腸上皮細胞がある一定の役割を果たしている可能性があると推察される。食餌誘導性肥満マウスでは、白色脂肪組織の炎症ならびにインスリン抵抗性が生じるが、肥満発症に先駆けて回腸における TNF-α mRNA レベルの増加および nuclear factor-κB の活性化が生じることが報告されたことから（Ding *et al.* 2010）、肥満型の腸内細菌叢を有することで、腸管（回腸）組織が炎症を引き起こし、腸管組織から脂肪組織へと何らかの情報伝達が行われた結果、脂肪組織の炎症が生じるという機序が存在することが示唆された。また、トリニトロベンゼンスルホン酸誘導性大腸炎およびインドメタシン誘導性潰瘍性回腸炎を発症したラットにおいて、血漿レプチン濃度が上昇する（Barbier *et al.* 1998）。この報告から、炎症を生じた腸管組織由来のシグナルは、脂肪組織の炎症に寄与するとともに脂肪細胞のレプチン分泌を誘導して肥満を調節しているのではないかと考えられる。実際、炎症を呈した腸管組織が分泌する TNF-α、IL-6、IL-1αおよび IL-1βなどの炎症性サイトカインは、脂肪細胞のレプチン分泌を誘導することが報告されている（Grunfeld *et al.* 1996、Sarraf *et al.* 1997、Gerhardt *et al.* 2001、Bruun *et al.* 2002、Simons *et al.* 2005）。一方、炎症を生じていない腸管組織由来シグナルが脂肪細胞のレプチン分泌の調節などを行っているか否かについては明らかにされていない。前述したように血中レプチン濃度は体脂肪量と相関するが、絶食時の血中レプチン濃度は低下し、その後、再摂食により上昇するため（Boden *et al.* 1996、Hardie *et al.* 1996、Ahren *et al.* 1997、Weigle *et al.* 1997）、肥満に先駆けて起こる腸管の炎症由来のシグナルだけが脂肪細胞のレプチン分泌を誘導するわけではないと考えられる。したがって、炎症を呈していない腸管組織も脂肪細胞のレプチン分泌に影響を及ぼす可能性があると想定されたため、本研究では、「正常な腸上皮細胞が、何らかの情報伝達を介して脂肪細胞のレプチン分泌を誘導する」と仮定し、このことに関する腸上皮細胞および脂肪細胞の連関を解明することを目的として、培養細胞を用いた生理学的な解析を行った。

第一章　腸上皮細胞が脂肪細胞のアディポカイン分泌ならびに遺伝子発現に及ぼす影響

Ⅰ　緒言

本章では、腸上皮細胞および脂肪細胞の連関を調べるために、腸上皮細胞として株化細胞である Caco-2 細胞を用いた。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来細胞株であり、培養に伴い、微絨毛、タイトジャンクション、およびドーム状構造が形成され（Rousset 1986、Traber *et al.* 1987）、さらに、刷子縁膜酵素の発現および極性形成による様々な輸送が行われ（Hidalgo and Borchardt 1990、Harris *et al.* 1992、Brandsch *et al.* 1994）、小腸上皮細胞様に分化することが知られている。また、脂肪細胞は、ヒト初代培養内臓前駆脂肪細胞および株化細胞である Simpson-Golabi-Behmel syndrome（SGBS）細胞を用いた。ヒト初代培養内臓前駆脂肪細胞は、分化誘導後、線維芽状から単房性の脂肪滴で満たされた球形状の形質へと変化する（Sugihara *et al.* 1986）。一方、SGBS 細胞は、ヒト SGBS 患者における皮下脂肪組織由来の前駆脂肪細胞株であり、分化誘導後、線維芽状から単房性の脂肪滴で満たされた球形状の形質へと変化し、初代培養脂肪細胞と同様にグルコース輸送、脂肪合成および脂肪分解などの代謝機能をもち、脂肪細胞様に分化する（Wabitsch *et al.* 2001、Fischer *et al.* 2008）。また、内分泌因子に対する応答性が、生体における脂肪細胞と同様であることが報告されている（Wabitsch *et al.* 2001）。

以上の株化細胞および初代細胞を用いて、腸上皮細胞および脂肪細胞の共培養、および腸上皮細胞 CM による脂肪細胞の培養を行い、アディポカインの産生・分泌の動態を解析した。

Ⅱ　材料および方法

1. 細胞培養

Caco-2 細胞

American Type Culture Collection より細胞株を購入した。10 cm プラスティックディッシュ（Greiner）を用い、基本培地中で 37℃、5% CO_2-95%空気環境下で培養した。基本培地として、ダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM）（Gibco）に 20%ウシ胎児血清（fetal bovine serum, FBS）（非働化処理済み、Corning）、1%イーグル最少培地（Gibco）、非必須アミノ酸（Gibco）、ペニシリン G カリウム（100 U/mL、明治製菓ファルマ）、ストレプトマイシン硫酸塩（100 μg/mL、和光純薬工業）、ゲンタマイシン硫酸塩（50 μg/mL、和光純薬工業）を添加したものを用いた。顕微鏡観察により、細胞がセミコンフルエントまで増殖したことを確認し、トリプシン消化で細胞を回収した後、基本培地を用いて、6 ウェルセルカルチャーインサート（BD Falcon）には 1.0×10^6 cells/well、12 ウェルセルカルチャーインサート（BD Falcon）には 4.0×10^5 cells/well となるように細胞数を調製し、それぞれのウェルに挿入したセルカルチャーインサートの上部（頂端側）コンパートメントに播種した。また、下部（基底膜側）コンパートメントには 3 mL/well（6 ウェルプレート）、および 1.5 mL/well（12 ウェルプレート）の基本培地のみを添加した。播種した細胞がコンフルエントに達した後、3 日に 1 回培地交換を行って培養を続け、Millicell-ERS（Merck Millipore）の電極を上部コンパートメントおよび下部コンパートメントに挿入して経上皮電気抵抗値（transepithelial electrical resistance, TEER）を測定し、1000 Ω/cm^{2}に達した細胞を分化した Caco-2 細胞とした（Hidalgo *et al.* 1989）。

また、分化した Caco-2 細胞の培地を除去し、DMEM/F-12 および Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640 培地を添加して 24 時間培養を行った後、インサートの下部コンパートメントの培地を回収した。こうして得られた培地を分化した Caco-2 細胞の CM とし、使用まで-20℃で凍結保存した。

ヒト初代前駆内臓脂肪細胞

Lonza よりヒト初代前駆内臓脂肪細胞を購入した。10 cm プラスティックディッシュを用い、基本培地中で 37℃、5% CO_2-95% 空気環境下で培養した。基本培地として、PGM-2（Lonza）に 10% FBS（SingleQuots、Lonza）、L-グルタミン（2 mM、SingleQuots、Lonza）、ゲンタマイシン（50 μg/mL、SingleQuots、Lonza）、アンフォテリシン-B（37 ng/mL、SingleQuots、Lonza）を添加したものを用いた。顕微鏡観察により、セミコンフルエントまで増殖したことを確認し、トリプシン消化で細胞を回収した後、基本培地を用いて 1.0×10^5 cells/well となるように細胞数を調製し、6 ウェルセルカルチャープレート（BD Falcon）のウェルに播種した。再び顕微鏡観察により、コンフルエントまで増殖したことを確認した後、培地を除去し、基本培地および分化誘導培地を 1 対 1 となるように混合した培地を添加した。この際に用いた分化誘導培地は、基本培地にデキサメタゾン（SingleQuots、Lonza）、インドメタシン（SingleQuots、Lonza）、3-イソブチル-1-メチルキサンチン（3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX）（SingleQuots、Lonza）を添加したものである（SingleQuots

付属の添加因子のため、濃度は未公開)。尚、分化誘導開始から 10 日目の細胞を成熟脂肪細胞とし、DMEM/F-12 で 10 時間培養した後、後述するように腸上皮細胞株との共培養、あるいは腸上皮細胞株の CM 中での培養に供した。

SGBS 細胞

細胞株は、Ulm 大学 Wabitsch 博士によって提供された。10 cm プラスティックディッシュを用い、基本培地中で 37℃、5% CO_2-95% 空気環境下で培養した。基本培地として、DMEM/F-12（Gibco）に（+）-パントテン酸カルシウム（170 nM、和光純薬工業)、ビオチン（330 nM、Sigma Aldrich)、10%FBS（非働化処理なし)、ペニシリン G カリウム（100 U/mL)、ストレプトマイシン硫酸塩（100 μg/mL)、ゲンタマイシン硫酸塩（50 μg/mL）を添加したものを用いた。顕微鏡観察により、セミコンフルエントまで増殖したことを確認し、トリプシン消化で細胞を回収した後、基本培地を用いて、6 ウェルセルカルチャープレートのウェルには 1.0×10^5 cells/well、12 ウェルセルカルチャープレートのウェルには 4.0×10^4 cells/well となるように細胞数を調製し、播種した。再び顕微鏡観察により、コンフルエントまで増殖したことを確認し、培地を除去し、分化誘導培地として Quick-Diff 培地を添加した。Quick-Diff 培地は、血清無添加の基本培地に、デキサメタゾン（25 nM、和光純薬工業)、IBMX（250 mM、Sigma Aldrich)、インスリン（20 nM、Sigma Aldrich)、トランスフェリン（0.01 mg/mL、Gibco)、ハイドロコルチゾン（100 nM、Sigma Aldrich)、3,3’,5-トリヨード-L -チロニンナトリウム塩（0.2 nM、Sigma Aldrich)、ロシグリタゾン（2 mM、和光純薬工業）を添加したものである。分化誘導開始から 4 日後、培地を除去し、維持培地として 3FC 培地を添加した。3FC 培地は、血清無添加の基本培地に、トランスフェリン（0.01 mg/mL)、インスリン（20 nM)、ハイドロコルチゾン（100 nM)、3,3’,5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩（0.2 nM）を添加したものである。以後、培地の交換は 4 日に 1 回行った。SGBS 細胞は、分化に伴い細胞内 TG 濃度が増加することが報告されている（Wabitsch *et al.* 2001)。本研究では、SGBS 細胞は、分化誘導開始から徐々に細胞内に脂肪滴を増大させる一方で、分化誘導開始から 20 日目を過ぎると、ウェルから剥離した。そのため、位相差顕微鏡観察による細胞形態の変化の確認により、分化誘導開始から 20 日目の細胞を分化した SGBS 細胞とした。さらに、DMEM/F-12 で 10 時間培養した後、腸上皮細胞株との共培養、あるいは腸上皮細胞株の CM 中での培養を行った。

2. 実験デザイン

実験 1　腸上皮細胞－脂肪細胞の共培養

ヒト初代培養内臓脂肪細胞および SGBS 細胞を培養したセルカルチャープレートのウェル中に、Caco-2 細胞を培養したセルカルチャーインサートを挿入することにより、脂肪細胞および腸上皮細胞の共培養を行った。実験 1 の流れについては Figure 1 に示した。

ヒト内臓脂肪細胞を培養した 6 ウェルセルカルチャープレートのウェルに、Caco-2 細胞を培養したセルカルチャーインサートを挿入し、インサートの上部および下部コンパートメントの培地を除去し、DMEM/F-12 を添加した。この際、インサートの上部コンパートメントに細胞を播種していないもの

をコントロールとした。共培養を開始してから 24 時間後に、インサートの下部コンパートメントから培地を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。

同様に、Caco-2 細胞および SGBS 細胞の共培養を行った。SGBS 細胞を培養した 12 ウェルセルカルチャープレートのウェルに、Caco-2 細胞を培養したセルカルチャーインサートを挿入し、インサートの上部および下部コンパートメントの培地を除去し、RPMI 1640 を添加した。共培養を開始してから 24 時間後に、インサートの下部コンパートメントから培地を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。また、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System 中の 1-チオグリセロール添加 BL バッファー（Promega）を添加して SGBS 細胞を 21 G シリンジ（テルモ）によりホモジナイズし、RNA 抽出まで-80℃で凍結保存した。

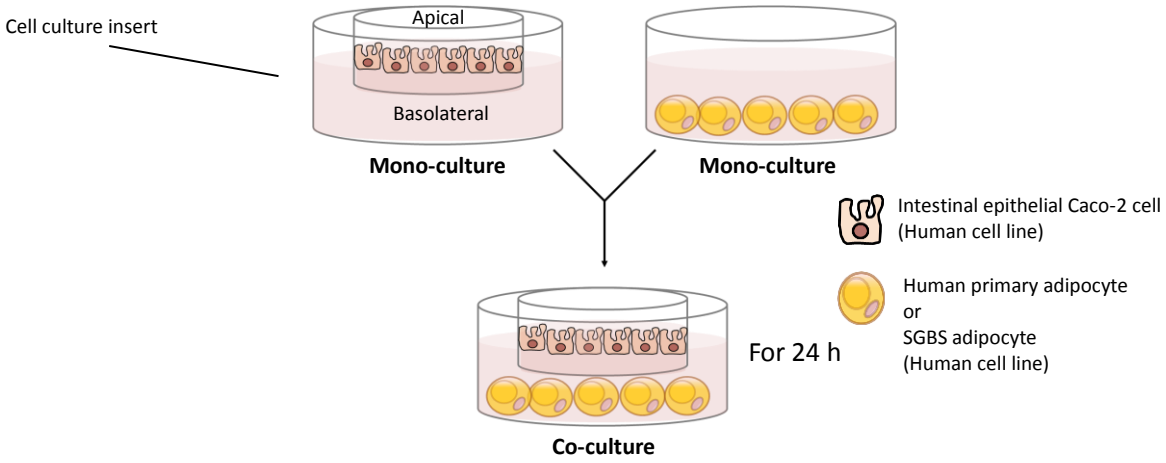

Figure 1 Schematic drawing of experimental design in experiment 1.

実験 2　腸上皮細胞 CM による脂肪細胞の培養

Caco-2 細胞 CM を用いて、ヒト初代内臓脂肪細胞および SGBS 細胞を培養した。実験の流れについては、Figure 2 に示した。

ヒト初代内臓脂肪細胞の培地に Caco-2 細胞 CM（培地は DMEM/F-12）を添加して培養した。この際、DMEM/F-12 を添加したものをコントロールとした。Caco-2 細胞 CM を添加してから 24 時間後に培養上清を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。また、実験 1 と同様に細胞ライセートを回収し、RNA 抽出まで-80℃で凍結保存した。

同様に、SGBS 細胞の培地に Caco-2 細胞 CM（培地は RPMI 1640）を添加して培養した。この際、RPMI 1640 を添加したものをコントロールとした。Caco-2 細胞 CM を添加してから 24 時間後に培養上清を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。また、実験 1 と同様に細胞ライセートを回収し、RNA 抽出まで-80℃で凍結保存した。さらに、細胞溶解バッファー（Tris-HCl pH 7.4 50 mM、NaCl 150 mM、ドデシル硫酸ナトリウム 0.1%、Triton X-100 1%、デオキシコール酸ナトリウム 1%）を用いて細胞ライセートを回収し、TG 濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。

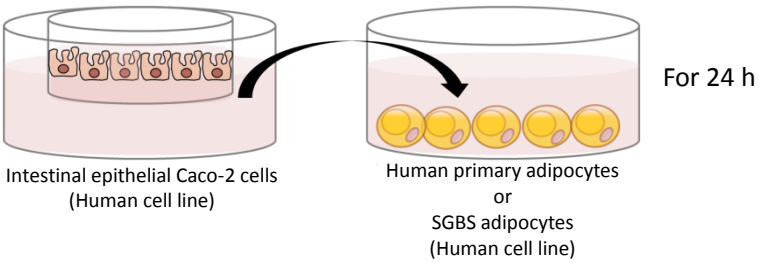

Figure 2 Schematic drawing of experimental design in experiment 2.

3. アディポカイン濃度の測定

培養上清中のレプチン、アディポネクチンおよびレジスチン濃度は、ELISA キット（レプチン: Human Leptin Duo Set, R&D Systems、アディポネクチン: Human Adiponectin/Acrp30 DuoSet, R&D Systems、レジスチン: Resistin Human ELISA, Bio Vendor）を用い、添付の取扱説明書にしたがって測定した。

4. RNA の分離と逆転写

細胞ライセートから、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System（Promega）を用いて、付属の取扱説明書にしたがい RNA を抽出した。また、RNA をキット付属のカラムから溶出する前に、カラムに DNase I（Promega）を添加してゲノム DNA を消化した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Kit（Toyobo）を用いた逆転写により、1 st strand complementary DNA (cDNA)を合成した。

5. mRNA 発現レベルの推定

1 st strand cDNA を鋳型として GeneAce SYBR qPCR Mix No ROX（ニッポンジーン）および各種遺伝子特異的プライマー（北海道システム・サイエンス）を用いて、Thermal Cycler Dice Real Time System（Takara）によりリアルタイム PCR を行い、各種サイトカインおよびケモカインの mRNA 発現レベルを推定した。また、内部標準として GAPDH を用いた。各遺伝子特異的なプライマーの配列は、Table 1 に示した。

Table 1 Primer sequences for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR).

Target genes	Primers	(5'－3')
acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1)	Forward	atgtctggcttgcacctagta
	Reverse	ccccaaagcgagtaacaaattct
Adiponectin	Forward	gtgatggcagagatggcac
	Reverse	acactgaatgctgagcggta
C/EBPα	Forward	tgcaaactcaccgctccaatg
	Reverse	gctgtagcctcgggaagga
fatty acid synthase (FAS)	Forward	acagcggggaatgggtact
	Reverse	gactggtacaacgagcggat
GAPDH	Forward	gaaggtgaaggtcggagtc
	Reverse	gaagatggtgatgggatttc
Leptin	Forward	tgtgcggattcttgtggctttg
	Reverse	ggaggagactgactgcgtgtg
LPL	Forward	acaagagagaaccagactccaa
	Reverse	gcggacactgggtaatgct
PPARγ	Forward	attgacccagaaagcgattcc
	Reverse	tcttccattacggagagatccac

6. TG 濃度の測定

細胞ライセートを氷上で 2 分間、SONIFIER 250（Branson）を用いて超音波処理し、サンプル中の TG 濃度を市販のキットを用い、添付の取扱説明書にしたがって測定した（トリグリセライド E-テストワコー 和光純薬工業）。

7. 統計処理

1 回のみ行った実験の結果はそれを表し、複数回行った実験の結果はその平均値±標準誤差で表した。平均値間の比較には、Student's *t*-test および One-way ANOVA を用いた。p 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意と認めた。

Ⅲ　結果

腸上皮細胞との共培養が脂肪細胞のレプチン発現・分泌を刺激する

ヒト初代内臓前駆脂肪細の分化誘導を開始してから顕微鏡観察を続け、10 日後には、細胞内脂肪滴が形成された（Figure 3A）。これを分化したヒト初代内臓脂肪細胞として用いた。腸上皮細胞が脂肪細胞のアディポカイン（レプチン、アディポネクチンおよびレジスチン）分泌に及ぼす影響を調べるために、セルカルチャーインサート（半透膜）を介して腸上皮細胞株 Caco-2 およびヒト初代内臓脂肪細胞の共培養を行い、インサートの下部コンパートメントにおける培地中のレプチン、アディポネクチンおよびレジスチン濃度を ELISA にて測定した。ヒト初代内臓脂肪細胞の単独培養と比較して、Caco-2 細胞との共培養では、培地中のレプチンおよびアディポネクチン濃度が高値であった（Figure 3B および 3C）。尚、培地中のレジスチン濃度は、Caco-2 細胞およびヒト内臓脂肪細胞の単独培養、ならびに共培養においても検出限界（12 pg/mL）以下であった。また、Caco-2 細胞の単独培養では、培地中のレジスチンだけではなく、レプチンおよびアディポネクチンも検出することはできなかった（レプチンおよびアディポネクチンの検出限界は未記載だが、標準曲線の最低濃度はそれぞれ 31.3 pg/mL、62.5 pg/mL）。

また、SGBS 細胞においては、分化誘導を開始してから 20 日後には、細胞内脂肪滴が形成された（Figure 3A）。これを分化した SGBS 細胞として用いた。Caco-2 細胞との共培養を行ったところ、SGBS 細胞の単独培養と比較して、培地中のレプチンおよびアディポネクチン濃度が有意に上昇した（Figure 3D および 3E）。尚、培地中のレジスチン濃度は、Caco-2 細胞および SGBS 細胞の単独培養、ならびに共培養においても検出限界以下であった。また、Caco-2 細胞の単独培養では、培地中のレジスチンだけではなく、レプチンおよびアディポネクチンも検出できなかった。

さらに、共培養を行った際の SGBS 細胞におけるレプチンおよびアディポネクチンの mRNA 発現レベルを推定したところ、SGBS 細胞の単独培養と比較して、Caco-2 細胞との共培養では、レプチンレベルが有意に高値を示す一方、アディポネクチンレベルは有意に低値を示した（Figure 3F および 3G）。

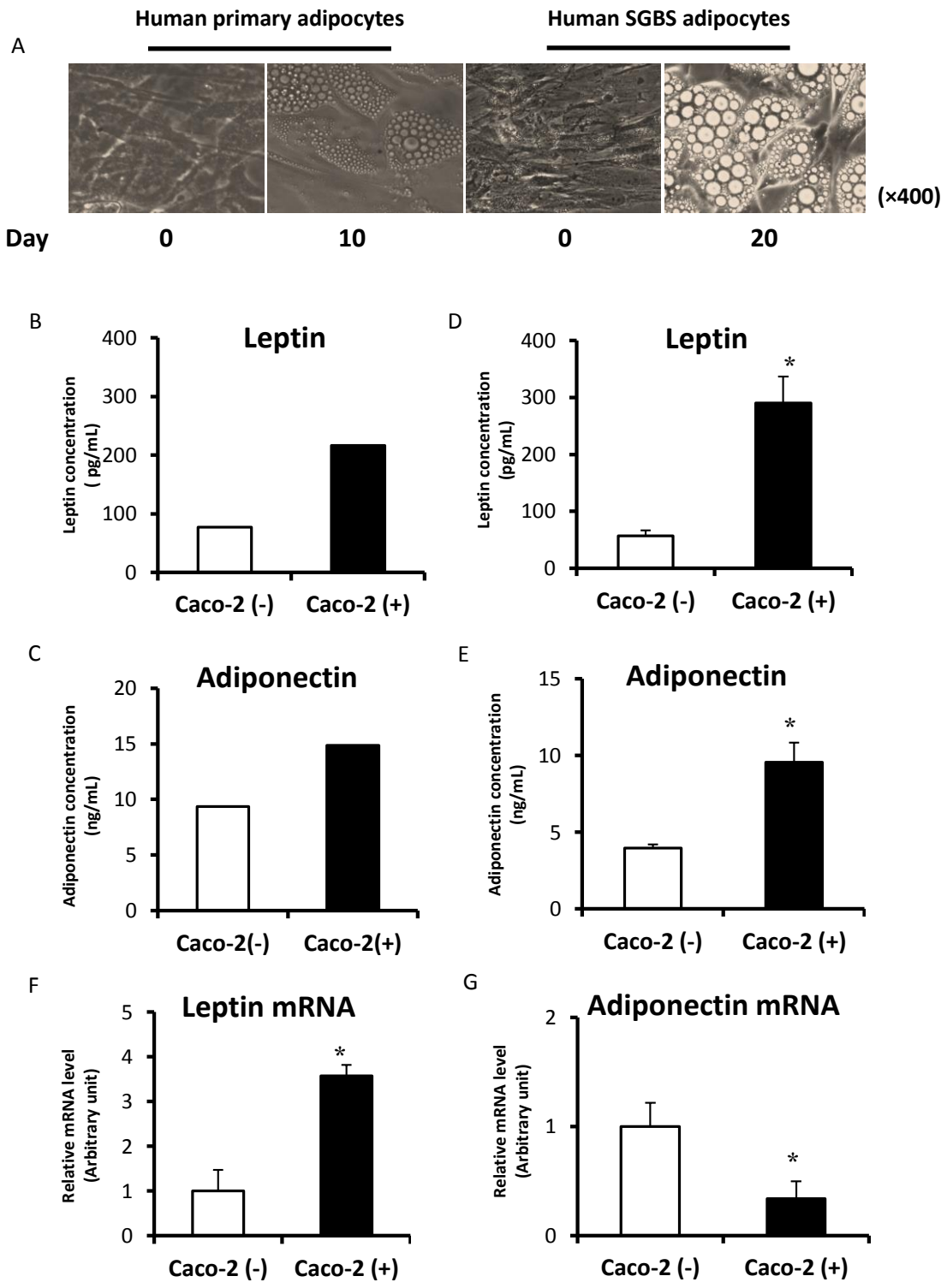

Figure 3

Effect of co-culturing intestinal epithelial cells with adipocytes on adipokine concentration in medium.
Chart A: Morphological changes in human primary adipocytes and SGBS cells. Chart B and C: Human intestinal epithelial Caco-2 cells were co-cultured with human primary adipocytes for 24 h. Adipokine concentrations in medium were measured by ELISA. The results represent a single experiment. Chart D-G: Caco-2 cells were co-cultured with human SGBS adipocytes for 24 h. Adipokine concentrations in medium were measured by ELISA (D and E), and gene expressions of adipokine were measured by qPCR (F and G). The results represent a single experiment (B and C), and expressed as the mean ± SEM of three independent experiments (D-G). *P*-values were estimated by Student's *t*-test (**p*< 0.05).

腸上皮細胞との共培養によって、脂肪細胞のアディポカイン分泌が増加したのは、腸上皮細胞と脂肪細胞の相互作用によって、脂肪細胞の分化が促進されたことによる可能性が考えられた。そこで、SGBS 細胞における分化マーカーの mRNA 発現レベルを比較したところ、SGBS 細胞の単独培養と比較して、Caco-2 細胞との共培養では、全ての分化マーカーでむしろ低値を示した（Figure 4A-E）。

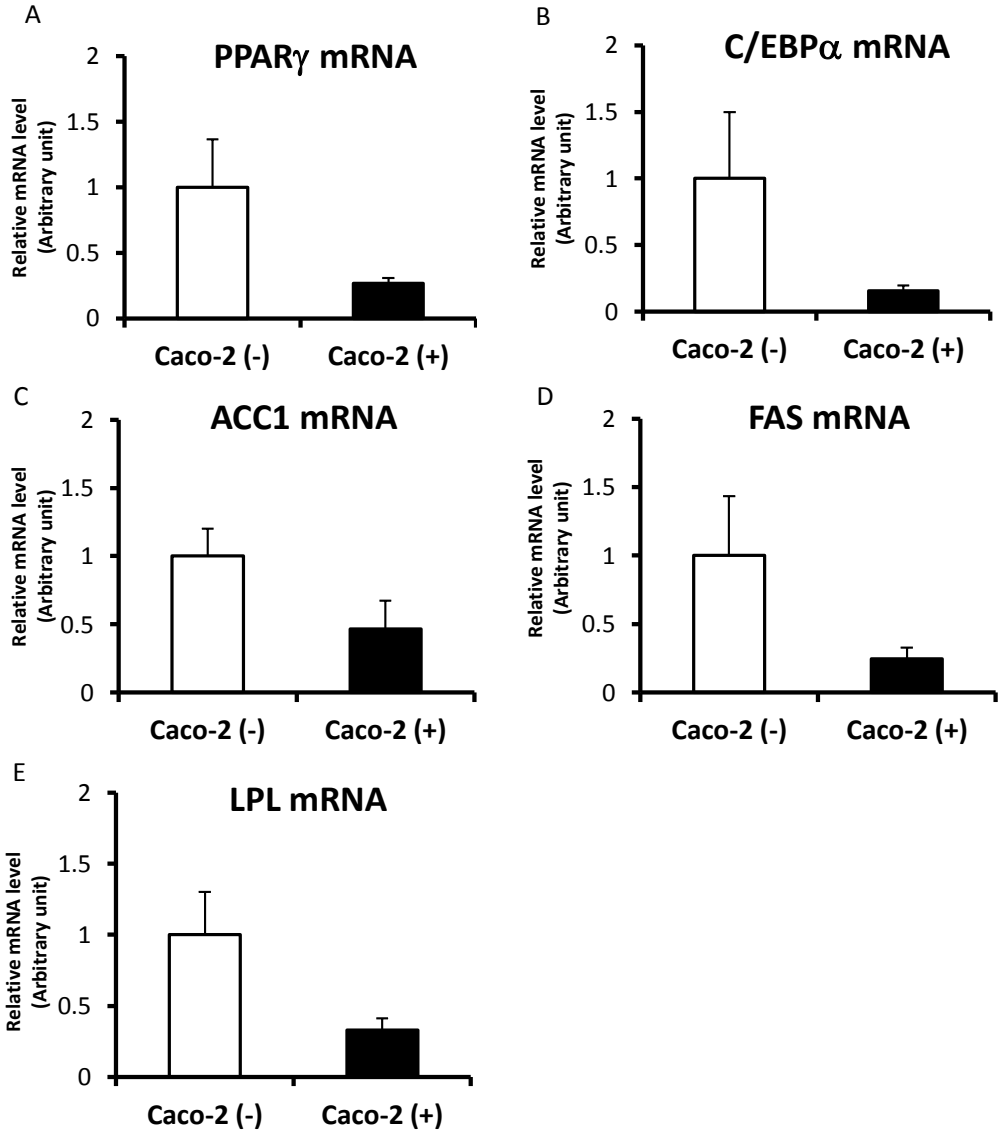

Figure 4
Effect of co-culturing intestinal epithelial cells with adipocytes on adipocytes differentiation.
Caco-2 cells were co-cultured with SGBS cells for 24 h. Gene expressions of adipocyte differentiation markers was measured by qPCR. The results are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments.

腸上皮細胞の CM が脂肪細胞のレプチン分泌を刺激する

Caco-2 細胞 CM 中でヒト初代内臓脂肪細胞の培養を行い、培地中のレプチン、アディポネクチンおよびレジスチン濃度を ELISA により測定した。その結果、培地中のレプチン濃度は CM 無添加の場合と比較して、CM を 100%の割合で添加した場合に有意に高値であった（Figure 5A）。このとき、アディポネクチン濃度もやはり高い傾向にあった（Figure 5B）。培地中のレジスチン濃度は全ての処理において検出限界以下であった。また、Caco-2 細胞 CM では、培地中のレジスチンだけではなく、レプチンおよびアディポネクチンも検出限界以下であった。

さらに、ヒト初代内臓脂肪細胞におけるレプチン mRNA 発現レベルを qPCR により推定した。その結果、全ての処理間において差は認められなかった（Figure 5C）。

脂肪細胞モデルとして SGBS 細胞を用いたときには、Caco-2 細胞 CM 中で培養を開始してから 48 時間後では、CM 無添加の細胞と比較して、CM を 100%の割合で添加した細胞において、培養上清中のレプチン濃度が有意に高値であった（Figure 5D）。同様の条件において 24 時間培養したとき、アディポネクチン濃度もやはり有意な高値を示した（Figure 5E）。レジスチン濃度は、全ての処理において検出限界以下であった。

さらに、SGBS 細胞におけるレプチン mRNA 発現レベルを qPCR により推定した。その結果、Caco-2 細胞の CM 中での培養開始後、20 時間まで低下を示し、CM の添加レベルはこのことに影響しなかった（Figure 5F）。

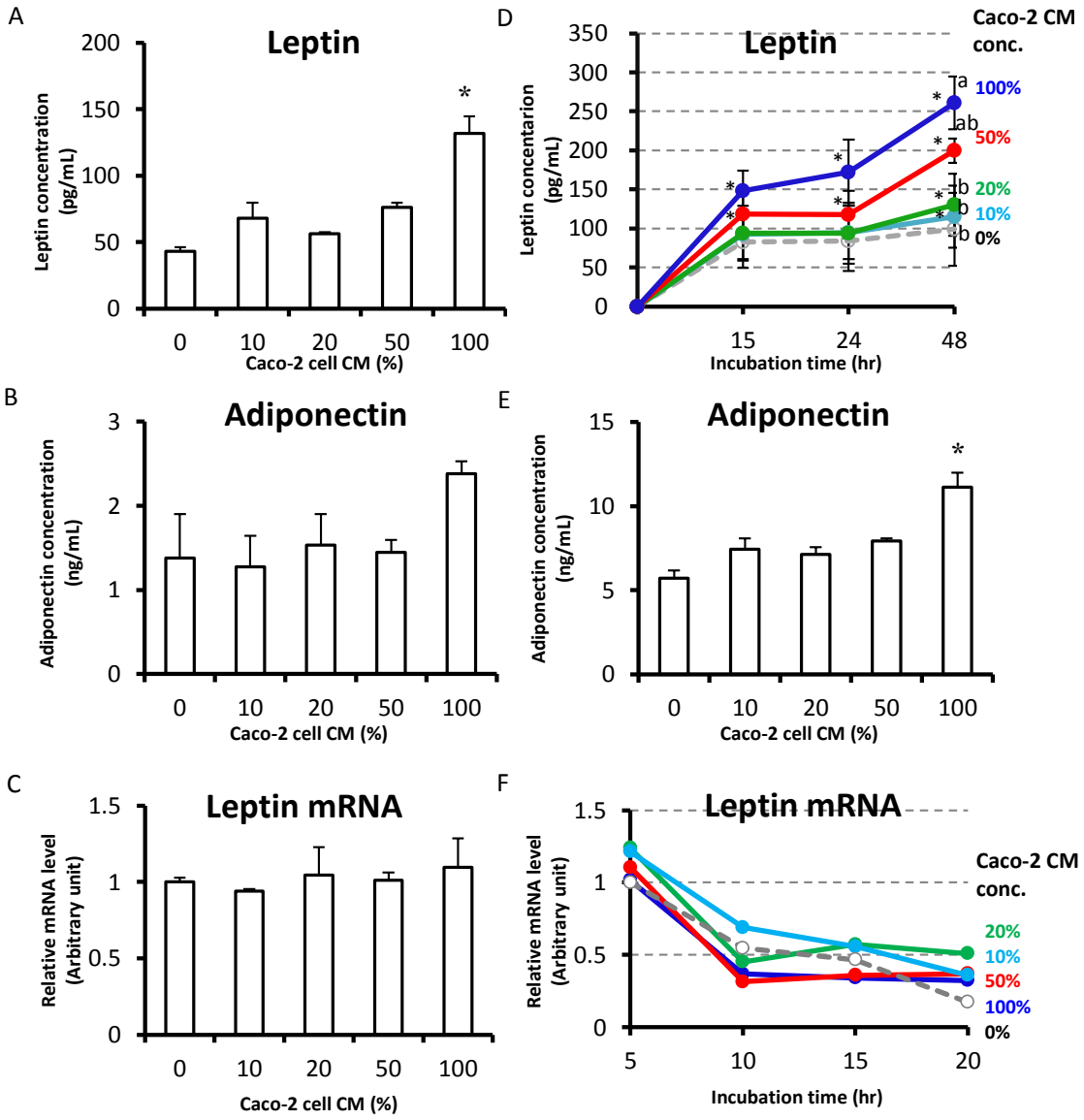

Figure 5

Effect of the CM from intestinal epithelial cells on the secretion of adipokine by adipocytes.

Chart A-C: Human primary adipocytes were cultured in the CM from Caco-2 cells for 24 h. Adipokine concentrations in the medium were measured by ELISA (A and B). Gene expression of leptin was measured by qPCR (C). Chart D-F: SGBS cells were cultured in the CM from Caco-2 cells. After 15, 24 and 48 h of culture, leptin concentrations in the media were measured by ELISA (D), whereas after only 24 h of culture, adiponectin concentration was measured by ELISA (E) and Gene expression of leptin was measured by qPCR (F). The results are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments (A-E), and represent a single experiment (F). Mean values with an asterisk are significantly different (p<0.05) as estimated by Dunnett's test following One-way ANOVA (A-C and E). Mean values with asterisks were significantly different (p<0.05) *vs.* 0 h at each concentration of CM supplement as estimated by Dunnett's test following One-way ANOVA, and mean values with different letters were significantly different (p<0.05) at each time point as estimated by Tukey-Kramer's test following One-way ANOVA.

また、腸上皮細胞 CM が脂肪細胞の分化を促進した結果、アディポカイン分泌が増加した可能性が考えられたため、脂肪細胞分化の指標として SGBS 細胞内の TG 濃度を測定した。その結果、Caco-2 細胞 CM 添加の影響は認められなかった（Figure 6）。

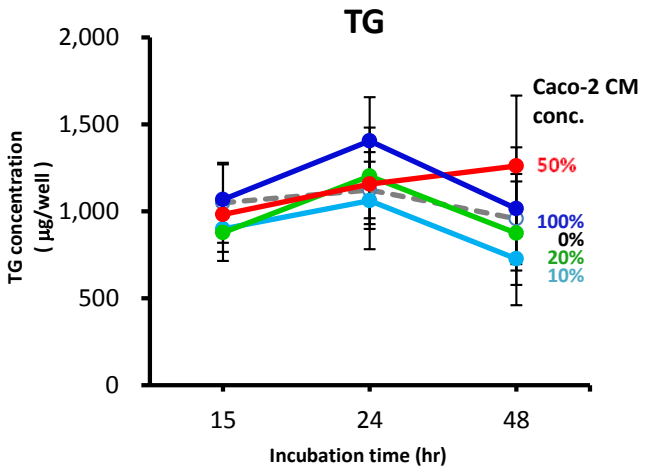

Figure 6
Effect of the CM from intestinal epithelial cells on TG concentration in adipocytes.
SGBS cells were cultured in the CM from Caco-2 cells. After 15, 24 and 48 h of culture, TG concentrations in the SGBS cells were measured. The result is expressed as the mean ± SEM of three independent experiments.

Ⅳ　考察

本研究において、ヒト初代培養脂肪細胞およびヒト脂肪細胞株 SGBS におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌が、ヒト小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞との非接触的共培養により増加することが、明確に示された。これらの結果は、腸上皮細胞が脂肪細胞におけるこれらのアディポカイン分泌を刺激する因子を放出すること示唆する。しかしながら、共培養系においては脂肪細胞が腸上皮細胞に何らかの影響を及ぼす可能性も考えられ、そのことが結果の解釈を複雑にする。そこで、前述の推察についてより直接的な検証を行うために、Caco-2 細胞の CM を脂肪細胞の培地に添加した。その結果、CM もやはり脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を増加させた。以上のことから、腸上皮細胞は脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激する液性因子を放出するものと推察した。

また、Caco-2 細胞と共培養したときの SGBS 細胞におけるレプチン mRNA レベルも上昇した。つまり、レプチン分泌の増加は翻訳前の段階で調節されていると考えられる。しかしながら、Caco-2 細胞の CM を添加した実験においては、SGBS 細胞においてレプチン分泌が増加したにもかかわらず、レプチン mRNA の上昇はみられなかった。このような共培養と CM 添加との違いを説明できるデータは得られていないが、共培養の際にはレプチン遺伝子の発現を刺激する因子が Caco-2 細胞から供給され続けるのに対し、CM 添加においてはそれが枯渇してしまうことによるのかもしれない。また、アディポネクチン mRNA レベルは Caco-2 細胞との共培養によりむしろ低下したので、観察されたアディポネクチン分泌促進は翻訳後の調節によるものと考えられる。

レプチンは分化した成熟脂肪細胞で強く発現することが知られている（Masuzaki *et al.* 1995）。このことから、腸上皮細胞が脂肪細胞のレプチンの遺伝子発現および分泌を亢進させたのは、脂肪細胞の分化を促進させたためであるとの指摘を受けるかもしれない。脂肪細胞は、前駆脂肪細胞から脂肪細胞へと分化する際に、脂肪細胞内の TG 蓄積および脂肪細胞特異的遺伝子の発現が上昇する。そこで、脂肪細胞の各種分化マーカーの mRNA 発現および脂肪細胞内 TG 濃度の測定を行った。PPARγ および C/EBPα は、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとも言われており、脂肪細胞の肥大化にも関与する転写因子であり、両者が協調して脂肪細胞の分化を誘導する（Barak *et al.* 1999、Kubota *et al.* 1999、Rosen *et al.* 1999、Wu *et al.* 1999）。この二つの転写因子の発現が上昇し、引き続き脂質合成に関する ACC および FAS、ならびに成熟脂肪細胞特異的に発現する LPL の発現が上昇することが明らかにされている（Bennett *et al.* 1995、Kawabe *et al.* 1996、Lopez et al. 1996）。単独培養を行った脂肪細胞と比較して、腸上皮細胞との共培養を行った脂肪細胞の各種分化マーカー（PPARγ、C/EBPα、ACC、FAS および LPL）の mRNA 発現は、むしろ低値を示した。また、腸上皮細胞 CM 無添加の脂肪細胞と比較して、腸上皮細胞 CM 中で培養を行った脂肪細胞内 TG 濃度は、さらに上昇することはなかった。したがって、腸上皮細胞による脂肪細胞のレプチンおよびアディポネクチン分泌の誘導は、脂肪細胞の分化促進に起因するものではないと考えられる。

第二章　脂肪細胞のアディポカイン分泌を刺激する腸上皮細胞由来因子の検討

Ⅰ　緒言

第一章で示した結果から、腸上皮細胞由来の何らかの液性因子が、脂肪細胞のレプチン分泌を促進するということが示唆された。そこで本章では、この液性因子に関する情報を得るために、いくつかの検討を行った。

炎症が生じた腸管組織は、TNF-αや IL-6 などの炎症性サイトカイン、および MCP-1 や IL-8 などのケモカインを分泌するが、これらの炎症性因子が脂肪細胞のレプチン分泌を促進させることが報告されている（Grunfeld *et al.* 1996、Sarraf *et al.* 1997、Gerhardt *et al.* 2001、Bruun *et al.* 2002、Simons *et al.* 2005）。

ところで、本研究で用いた Caco-2 細胞は、ヒト結腸癌由来の細胞株であり、コンフルエントに達した後､14 日以上培養すると小腸吸収上皮細胞様に分化することが知られている（Sánchez *et al.* 1996）。そこで、本研究で想定しているレプチン分泌刺激因子の放出が Caco-2 細胞の分化に依存するか否かを明らかにするために、コンフルエントから 1 日目の未分化 Caco-2 細胞 CM による SGBS 細胞の培養を行った。また、想定しているレプチン分泌刺激因子が、種の違いを越えて機能するか否かについて明らかにするために、マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を SGBS 細胞の代わりに用いて解析した。さらに、想定しているレプチン分泌刺激因子の熱安定性についても調べた。

Ⅱ　材料および方法

1.　細胞培養

3T3-L1 細胞

American Type Culture Collection より細胞株を購入した。10 cm プラスティックディッシュを用い、基本培地中で 37℃、5% CO_2-95% 空気環境下で培養した。基本培地として、DMEM に 10% FBS（非働化処理済み）、ペニシリン G カリウム（100 U/mL）、ストレプトマイシン硫酸塩（100 μg/mL）、ゲンタマイシン硫酸塩（50 μg/mL）を添加したものを用いた。顕微鏡観察によりセミコンフルエントまで増殖したことを確認し、トリプシン消化で細胞を回収した後、基本培地を用いて 12 ウェルセルカルチャープレートのウェルには 4.0×10^4 cells/well、24 ウェルセルカルチャープレートのウェルには 1.0×10^4 cells/well となるように細胞を調製し、播種した。再び細胞がセミコンフルエントまで増殖したことを確認した後、培地を除去し、分化誘導培地を添加した。分化誘導培地は、基本培地にデキサメタゾン（0.25 μM）、IBMX（0.5 mM）、インスリン（10 μg/mL）を添加したものである。分化誘導開始から 48 時間後、培地を除去し、分化促進培地を添加した。分化促進培地は、基本培地にインスリン（5 μg/mL）を添加したものである。以後、培地の交換は 2 日に 1 回行い、分化誘導開始から 12 日目の細胞を脂肪細胞として用いた。また、3T3-L1 細胞の培地を除去し、RPMI 1640 で 10 時間培養した後、腸上皮細胞株の CM 中での培養を行った。

SGBS 細胞

第一章と同様の方法で培養を行った。

Caco-2 細胞

第一章と同様の方法で、12 ウェルセルカルチャーインサートに細胞を播種した。顕微鏡観察によりコンフルエントまで増殖したことを確認し、さらに 24 時間培養したものを未分化 Caco-2 細胞とした。また、未分化 Caco-2 細胞 CM を以下のように調製した。Caco-2 細胞の培地を除去し、RPMI 1640 を添加して 24 時間培養を行った後、インサートの下部コンパートメントの培地を回収した。こうして得られた未分化 Caco-2 細胞 CM は、使用まで-20℃で凍結保存した。一方、第一章と同様の方法で得られた分化 Caco-2 細胞 CM を 100℃で 10 分間、加熱した。加熱処理を行った Caco-2 細胞 CM は、使用まで-20℃で凍結保存した。

2.　実験デザイン

実験 1　未分化腸上皮細胞 CM による脂肪細胞の培養

SGBS 細胞の培地に、未分化 Caco-2 細胞 CM（培地は RPMI 1640）を添加し、培養した。この際、RPMI 1640 を添加し、培養したもの、および分化 Caco-2 細胞 CM を添加し、培養したものをそれぞれ陰性および陽性コントロールとした。未分化 Caco-2 細胞 CM を添加してから 24 時間後に培地を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。

実験 2　腸上皮細胞 CM による 3T3-L1 細胞の培養

3T3-L1 細胞の培地に Caco-2 細胞 CM（培地は RPMI 1640）を添加し、培養した。この際、RPMI 1640 を添加し、培養したものをコントロールとした。Caco-2 細胞 CM を添加してから 24 時間後に培地を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。

実験 3　加熱処理した腸上皮細胞 CM による脂肪細胞の培養

SGBS 細胞の培地に、加熱処理した Caco-2 細胞 CM（培地は RPMI 1640）を添加し、培養した。この際、RPMI 1640 を添加し、培養したもの、および加熱処理を行っていない Caco-2 細胞 CM を添加し、培養したものをそれぞれ陰性および陽性コントロールとした。加熱処理した Caco-2 細胞 CM を添加してから 24 時間後に培地を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。

3. アディポカイン、サイトカインおよびケモカイン濃度の測定

培養上清中のヒトレプチン、アディポネクチンおよびレジスチン濃度は、ELISA キットを用い、第一章と同様に測定した。また、マウスレプチン濃度は、ELISA キット（Mouse/Rat Leptin Quantikine ELISA kit R&D Systems）を用い、添付の取扱説明書にしたがって測定した。Caco-2 細胞 CM 中の macrophage inflammatory proteins-1 α（MIP-1α）、IL-8、MCP-1、IL-6 および TNF-αも同様に、ELISA キット（MIP-1α: CCL3 (Human) ELISA Kit,　Abnova、IL-8: Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience、MCP-1: Human MCP-1 ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience、IL-6: Human IL-6 ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience、TNF-α: Human TNF-α ELISA Ready-SET-Go!, eBioscience）を用い、添付の取扱説明書にしたがって測定した。

4. グルコース濃度の測定

回収した Caco-2 細胞 CM 中のグルコース濃度を市販のキットを用い、添付の取扱説明書にしたがって測定した（グルコース CⅡ－テストワコー　和光純薬工業）。

5. 統計処理

1 回のみ行った実験の結果はそれを表し、複数回行った実験の結果はその平均値±標準誤差で表した。平均値間の比較には、One-way ANOVA を用いた。p 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意と認めた。

Ⅲ　結果

Caco-2 細胞の分化は SGBS 細胞のアディポカイン分泌に影響しない

Caco-2 細胞の分化マーカーである TEER を測定した結果、コンフルエントから 17 日目まで有意に上昇した（Figure 7A）。

コンフルエント到達後、1 日目および 14 日目以降の Caco-2 細胞から調製した CM 中で SGBS 細胞の培養を行い、培地中のレプチン濃度を ELISA にて測定した。その結果、Caco-2 細胞 CM 無添加で培養した SGBS 細胞と比較して、14 日目以降の Caco-2 細胞 CM を添加して培養した SGBS 細胞では、培地中のレプチンおよびアディポネクチン濃度は有意に高値であったが、1 日目の Caco-2 細胞 CM を添加して培養した SGBS 細胞では、有意な差は認められなかった（Figure 7BC）。

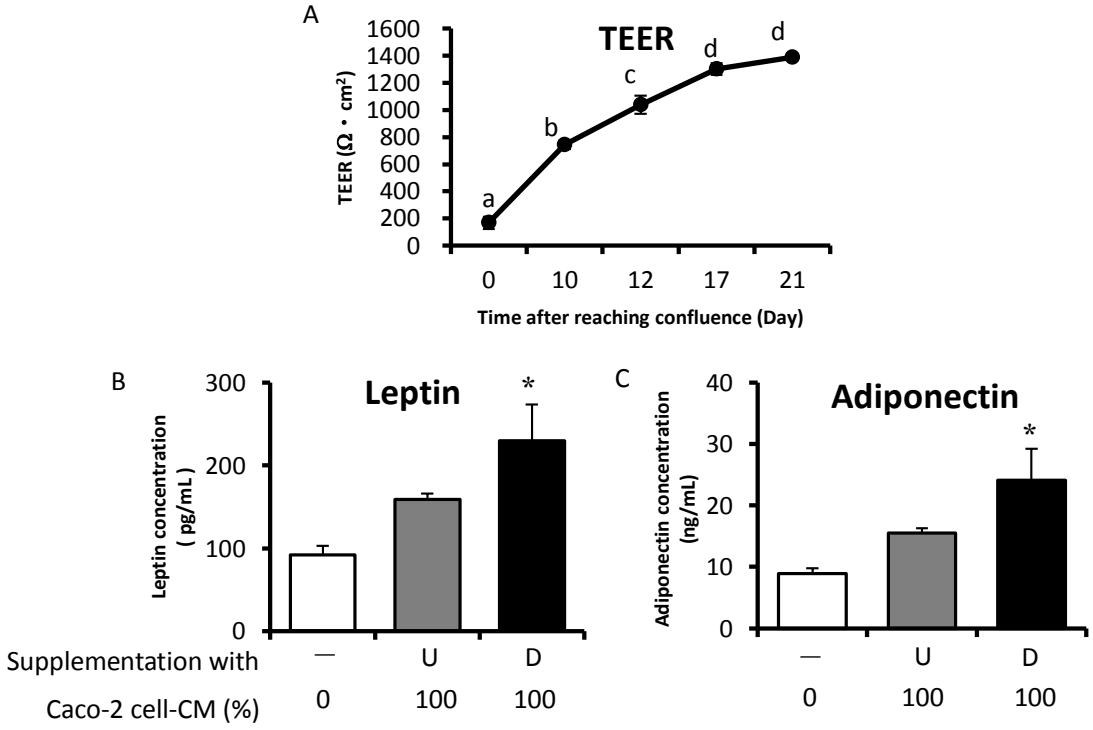

Figure 7
Effect of the CM from undifferentiated and differentiated intestinal epithelial cells on the secretion of adipokines by adipocytes.
Chart A: The time-course of changes in transepithelial electrical resistance (TEER), a marker of enterocytic differentiation, after Caco-2 cells reached confluence. Chart B and C: SGBS cells were cultured in the CM from undifferentiated (U) and differentiated (D) Caco-2 cells for 24 h. Leptin (B) and adiponectin (C) concentration in the medium were measured by ELISA. The results are expressed as the mean ± SEM of the three independent experiments. Mean values with different letters are significantly different (p<0.05) as estimated by Tukey Kramer's test following one-way ANOVA (A). Mean values with astarisks are significantly different (p<0.05) as estimated by Dunnett's test following One-way ANOVA (B and C).

Caco-2 細胞の CM は 3T3-L1 細胞のレプチン分泌を刺激しない

マウス脂肪細胞株 3T3-L1 の分化誘導を開始してから顕微鏡観察を続け、12 日後には、細胞内脂肪滴が形成された（Figure 8A）。これを分化した 3T3-L1 細胞として用いた。腸上皮細胞 CM 中で脂肪細胞を培養する際に、腸上皮細胞と種の異なる脂肪細胞を用いた場合も、脂肪細胞のレプチン分泌を誘導するか否かを調べるために、Caco-2 細胞 CM 中でマウス脂肪細胞株 3T3-L1 の培養を行ったとこ

ろ、培地中のレプチン濃度には差がみられなかった（Figure 8B）。

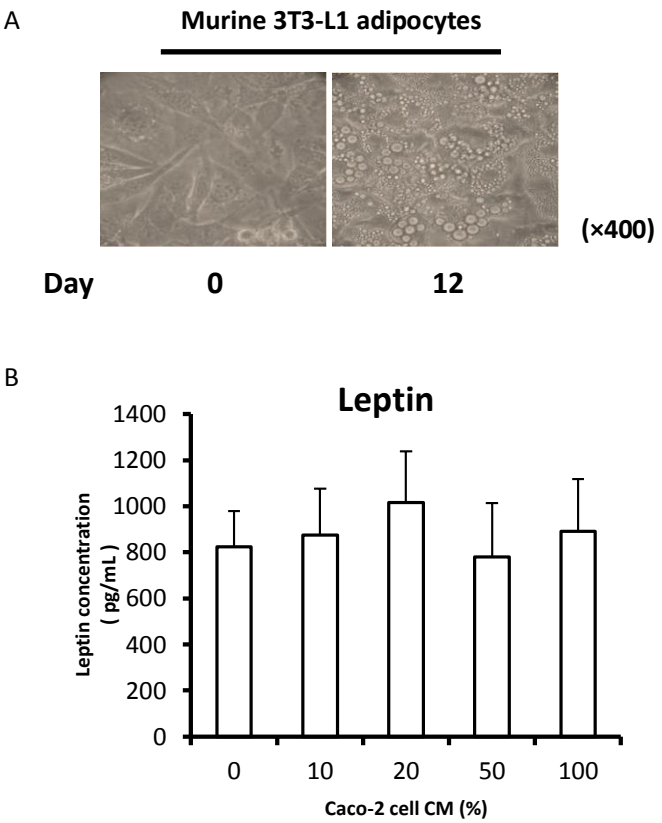

Figure 8
Effect of the CM from human intestinal epithelial cells on the secretion of adipokine by murine adipocytes.
Chart A: Morphological changes in murine 3T3-L1 adipocytes. Chart B: 3T3-L1 cells were cultured in the CM from human intestinal epithelial Caco-2 cells for 24 h. Leptin concentration in the medium was measured by ELISA. The results are expressed as the mean ± SEM of the three independent experiments.

加熱処理は Caco-2 細胞 CM のレプチン分泌刺激作用に影響しない

加熱処理した腸上皮細胞 CM が、脂肪細胞のレプチン分泌に影響するか否かを調べるために、100℃で 10 分間、加熱処理を行った Caco-2 細胞 CM 中で SGBS 細胞の培養を行い、培地中のレプチン濃度を ELISA にて測定した。その結果、Caco-2 細胞 CM 無添加で培養した SGBS 細胞と比較して、加熱処理した Caco-2 細胞 CM を添加して培養した SGBS 細胞では、加熱処理を行っていない Caco-2 細胞 CM を添加して培養した SGBS 細胞と同程度にレプチン濃度は高値を示した（Figure 9）。

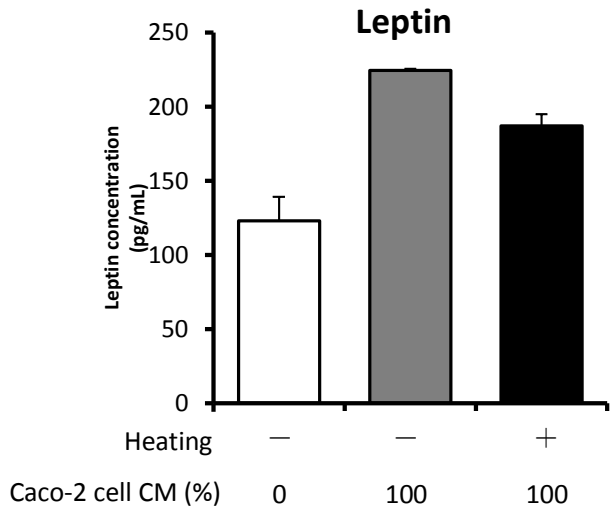

Figure 9
Effect of the heat treated CM from intestinal epithelial cells on the secretion of adipokine by adipocytes.
SGBS cells were cultured in the heat treated CM from Caco-2 cells for 24 h. Leptin concentration in the medium was measured by ELISA. The result is expressed as the mean ± SEM of two independent experiments.

Caco-2 細胞 CM 中のグルコース濃度を測定した結果、新鮮培地中のグルコース濃度および Caco-2 細胞 CM 中のグルコース濃度に差は観察されなかった（1.90 mg/mL *vs.* 1.58 mg/mL）。また、TNF-α、IL-6、MIP-1α、IL-8 および MCP-1 濃度を測定したところ、全て検出限界以下の濃度であった（TNF-α, 4 pg/mL; IL-6, 2 pg/mL; MIP-1α, 10 pg/mL; IL-8, 2 pg/mL; MCP-1, 7 pg/mL）。

Ⅳ　考察

本研究において、腸上皮細胞由来の何らかの因子が脂肪細胞のレプチンおよびアディポネクチン分泌を促進することが示唆されたが、その因子の本体は明らかではない。本章では、この因子に関する情報を得るための検討を行った。

本研究で腸上皮細胞のモデルとして用いた Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来細胞株であり、コンフルエントに到達してから 14 日以後に小腸吸収上皮細胞と同様の分化形質を発現することが知られている。例えば、頂端側にスクラーゼやペプチダーゼなどの消化酵素を発現すること、P-糖タンパクなどの栄養素吸収担体を発現すること（Hidalgo and Borchardt 1990、Harris *et al.* 1992、Brandsch *et al.* 1994）、ならびにタイトジャンクションの形成などである（Traber *et al.* 1987）。そこで本研究では、Caco-2 細胞の分化が脂肪細胞のレプチンおよびアディポネクチン分泌に影響を及ぼすか否かを調べた。Caco-2 細胞の小腸吸収上皮細胞様の分化にともなうタイトジャンクションの形成により TEER が上昇することが知られているので（Hidalgo *et al.* 1989）、コンフルエント到達後の TEER を追跡したところ、14 日目まで上昇を続けた。そこで、コンフルエントに到達してから 1 日目の細胞を未分化 Caco-2 細胞、14 日目の細胞を分化 Caco-2 細胞とみなし、それらの CM を調製した。それらを SGBS 脂肪細胞に添加して培養し、レプチンおよびアディポネクチン濃度を測定した結果、14 日目の Caco-2 細胞の CM は SGBS 細胞培養上清におけるレプチンおよびアディポネクチン濃度を上昇させたが、1 日目の CM 添加は上昇させなかった。これらの結果から、脂肪細胞のレプチンおよびアディポネクチン分泌を促進する腸上皮由来液性因子は、分化した小腸吸収上皮細胞により放出され、未分化腸上皮細胞はそのような能力が低いことが示唆された。

次に、脂肪細胞のレプチンおよびアディポネクチン分泌促進因子が、種の壁を越えた活性を有するか否かを調べた。すなわち、Caco-2 細胞の CM をマウス由来 3T3-L1 脂肪細胞に添加した。その結果、レプチン分泌に変化は認められなかった。したがって、腸上皮細胞に由来するレプチンおよびアディポネクチン分泌促進因子は、種特異的である可能性が推察された。

過去の研究により、脂肪細胞におけるレプチン分泌は炎症性サイトカインおよびケモカインにより促進されることが報告されている（Grunfeld *et al.* 1996、Sarraf *et al.* 1997、Gerhardt *et al.* 2001、Bruun *et al.* 2002、Simons *et al.* 2005）。腸上皮細胞は、炎症性サイトカインおよびケモカインである TNF-α、IL-6、IL-8、MIP-1αおよび MCP-1 などを分泌することが知られているため（van Deventer 1997）、本研究で示唆された脂肪細胞のレプチン分泌を刺激する腸上皮細胞由来因子が、これらの炎症性サイトカインおよびケモカインである可能性が想定された。そこで、Caco-2 細胞の CM における TNF-α、IL-6、IL-8、MIP-1αおよび MCP-1 を定量した結果、いずれも検出限界以下であった。きわめて低濃度の炎症性サイトカインおよびケモカインが脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激するか否かについては、厳密に言えば、それらを脂肪細胞の培地に添加した際のレプチン分泌を調べる必要があるが、それらが腸上皮細胞に由来するレプチン分泌刺激因子である可能性は低いと考えている。

さらに、グルコースおよびその代謝産物が脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激することが報告されている（Mueller *et al.* 1998、Wellhoener *et al.* 2000）。しかしながら、本研究においては、脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激する Caco-2 細胞の CM 中のグルコース濃度と新鮮培地におけるグ

ルコース濃度との間に差を認めなかった。すなわち、腸上皮細胞に由来するレプチン分泌刺激因子がグルコースである可能性は低いと考えた。

以上のように、腸上皮細胞に由来する脂肪細胞のレプチン分泌刺激因子について検討した結果、そのものは分化した小腸粘膜吸収上皮細胞が放出する熱安定性の物質であり、また従来よりレプチン分泌を刺激することが知られている炎症性サイトカイン、ケモカインおよびグルコース以外のものであると考えられた。Murakami ら、および Wabitsch らは、グルココルチコイドが脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激することを報告している（Murakami *et al.* 1995、Wabitsch *et al.* 1996）。一方、Caco-2 細胞のような腸上皮細胞株がグルココルチコイドであるコルチゾールを産生・分泌することも報告されている（Sidler *et al.* 2011）。腸上皮細胞に由来する脂肪細胞のレプチン分泌刺激因子を同定するためにはさらなる研究が必要であるが、グルココルチコイドをその候補として検証することは興味深い。例えば、グルココルチコイド合成阻害剤であるメチラポンを添加して培養した Caco-2 細胞の CM が脂肪細胞のレプチン分泌を刺激するか否かを確かめることも有効であろう。

第三章　マウス腸粘膜ホモジネート上清が脂肪細胞のレプチン分泌に及ぼす影響

Ⅰ　緒言

本研究において、ヒト初代脂肪細胞および SGBS 脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌が、ヒト腸上皮細胞株 Caco-2 との共培養およびその CM により促進されることが示された。これらのことは、腸上皮細胞が脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激する何らかの液性因子を放出することを示唆する。しかしながら、これらの現象はあくまでも培養細胞系における観察結果であり、*in vivo* においても同様の現象がみられるか否か、明らかではない。そこで第三章では、このことについての情報を得るために、マウスの腸粘膜ホモジネート上清がマウス 3T3-L1 脂肪細胞におけるアディポカイン分泌に及ぼす影響を調べた。すなわち、腸上皮細胞が脂肪細胞おけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激する液性因子を放出することを示すための *ex vivo* の実験を行った。

Ⅱ　材料および方法

1.　動物飼育およびサンプリング

雌 C57BL/6J JmsSlc（B6）マウスを日本 SLC から、雌 KK-Ay/TaJcl （KK）マウスを日本クレアから購入した。購入したマウスは、標準プラスティックケージ内にて 23±2℃、1 日 12 時間照明の環境下で飼育し、標準固型飼料（MR ストック、日本農産工業）を自由摂食させた。7 週齢の B6 マウスおよび 12 週齢の KK マウスをセボフルラン麻酔下で頸動脈からの放血により安楽死させ、B6 マウスから小腸、結腸および肝臓、KK マウスから小腸および結腸を摘出した。得られた小腸を近位側および遠位側に二等分し、それぞれ空腸および回腸とした。氷冷 PBS を用いて腸管内を洗浄し、縦に切開した後、スライドガラスを用いて腸粘膜を削剥し、回収した。腸粘膜および肝臓を DMEM に懸濁し、ホモジナイズ（3,000 rpm、5 分間、氷冷下）した。ホモジネートを遠心分離後（12,000×rpm、5 分間、4℃）、上清を回収し、後述する方法によりタンパク濃度を測定した。タンパク濃度測定後の上清を 0.2 μm ディスポーザブルメンブレンフィルター（Advantec）により濾過滅菌し、3T3-L1 細胞に添加するまで-20℃で保存した。尚、本研究における動物実験は、
国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づき、科学的および動物福祉の観点から適正に行った。

2.　細胞培養

<u>3T3-L1 細胞</u>

第二章と同様の方法で培養した。

3.　実験デザイン

<u>実験 1　マウス組織ホモジネート上清による脂肪細胞の培養</u>

3T3-L1 細胞の培地に、タンパク濃度を 50 μg/mL に調整した B6 マウスの空腸、回腸および結腸粘膜ホモジネート、加えて肝臓ホモジネート上清を添加し、培養した。この際、DMEM を添加し、培養したものをコントロールとした。マウスの腸粘膜および肝臓ホモジネート遠心上清を添加してから 24 時間後に培地を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。実験の流れについては、Figure 11 に示した。

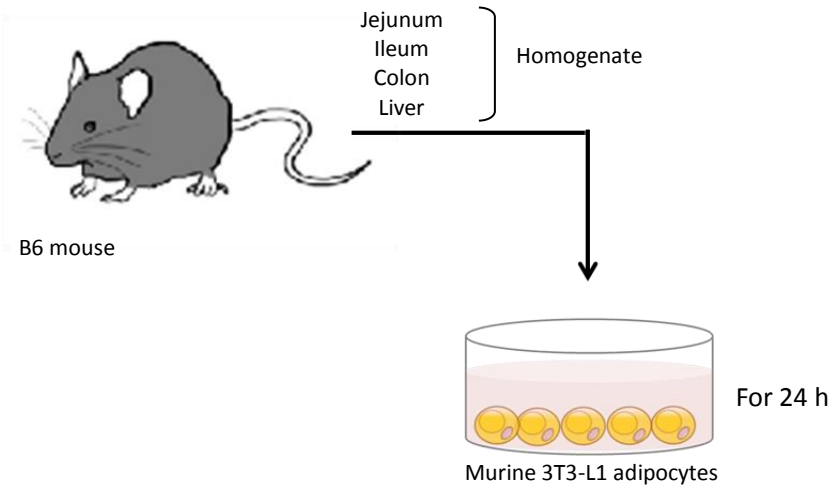

Figure 11 Schematic drawing of experimental design in experiment 1.

実験 2　肥満マウス腸粘膜ホモジネート上清による脂肪細胞の培養

3T3-L1 細胞の培地に、タンパク濃度を 50 μg/mL に調整した B6 マウスおよび KK マウスの空腸、回腸および結腸粘膜ホモジネート上清を添加し、培養した。それぞれのマウスの腸粘膜ホモジネート上清を添加してから 24 時間後に培地を回収し、アディポカイン濃度の測定まで-20℃で凍結保存した。実験の流れについては、Figure 12 に示した。

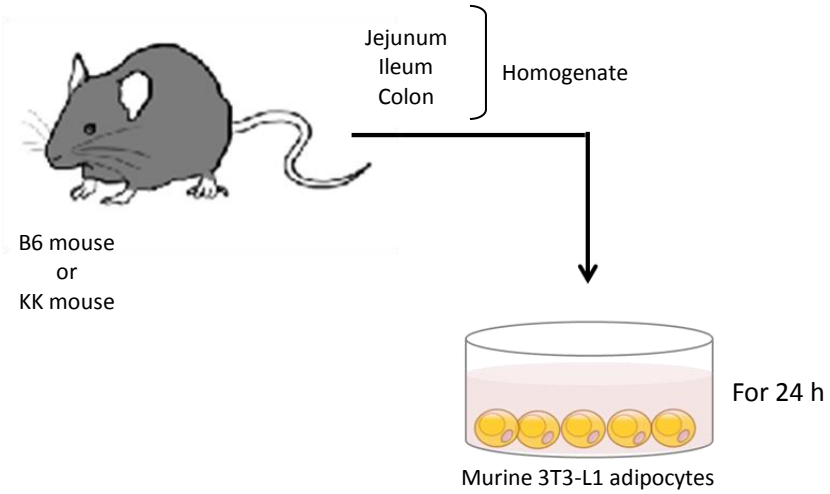

Figure 12 Schematic drawing of experimental design in experiment 2.

3.　アディポカイン濃度の測定

培養上清中のレプチン濃度は、第二章と同様に測定した。また、アディポネクチン濃度は、ELISA キット（Mouse Adiponectin/Acrp30 DuoSet, R&D Systems）を用いて測定した。

4. タンパク濃度の測定

回収したマウスの腸粘膜および肝臓ホモジネートのタンパク濃度を、市販のキットを用いて測定した（BCA Protein Assay Kit, Pierce）。

5. 統計処理

実験の結果はその平均値±標準誤差で表した。平均値間の比較には、One-way ANOVA および Unpaired *t*-test を用いた。*p* 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意と認めた。

Ⅲ　結果

マウスの回腸ホモジネート上清は 3T3-L1 細胞のアディポカイン分泌を刺激する

B6 マウスの空腸、結腸および肝臓ホモジネートを添加したときの、3T3-L1 細胞の培地中のレプチンおよびアディポネクチン濃度は、組織ホモジネート無添加の場合と差がみられなかった。しかしながら、回腸粘膜ホモジネートを添加した際のレプチンおよびアディポネクチン濃度は無添加の場合に比較して有意な高値を示した。尚、各組織のホモジネート上清におけるレプチンおよびアディポネクチン濃度は、全て検出限界（レプチン, 22 pg/mL; アディポネクチンは未記載であったが、標準曲線の最低濃度は 31 pg/mL）以下であった。

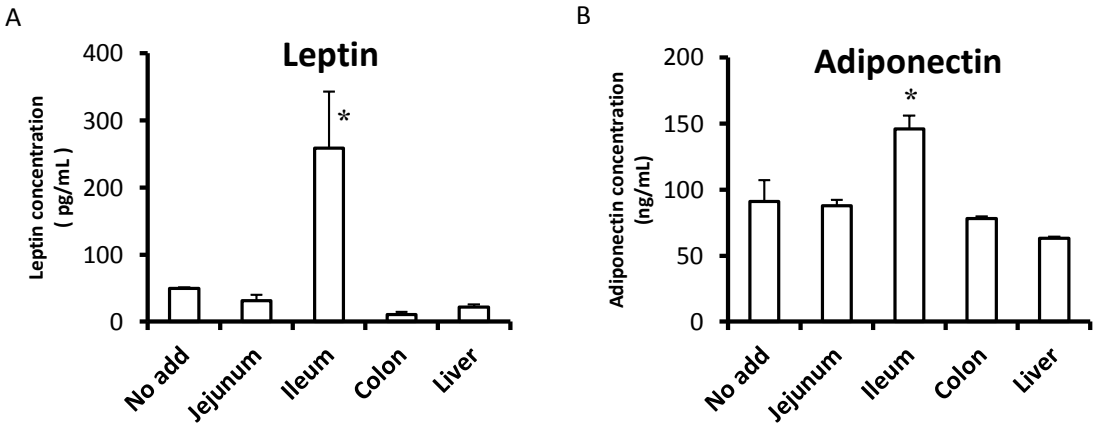

Figure 13
Effect of intestinal tissue homogenates on the secretion of adipokine by adipocytes.
3T3-L1 cells were cultured in jejunal, ileal, colonic or liver tissue homogenate of C57BL/6J JmsSlc (B6) mice for 24 h. Leptin (A) and adiponectin (B) concentration in the medium was measured by ELISA. The result are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. Mean values with astarisks are significantly different (p<0.05) as estimated by Dunnett's test following One-way ANOVA.

肥満 KK マウスの回腸粘膜ホモジネート上清は 3T3-L1 細胞のアディポカイン分泌を刺激しない

肥満が腸粘膜組織ホモジネートによる脂肪細胞のアディポカイン分泌促進効果に与える影響を調べるために、KK マウスおよび B6 マウスの腸粘膜組織のホモジネート上清中で 3T3-L1 細胞の培養を行い、培地中のアディポカイン濃度を比較した。その結果、レプチンおよびアディポネクチン濃度は、B6 マウスの回腸ホモジネート上清を添加した場合に比較して、KK マウスの場合に有意に低値であった（Figure 14AB）。

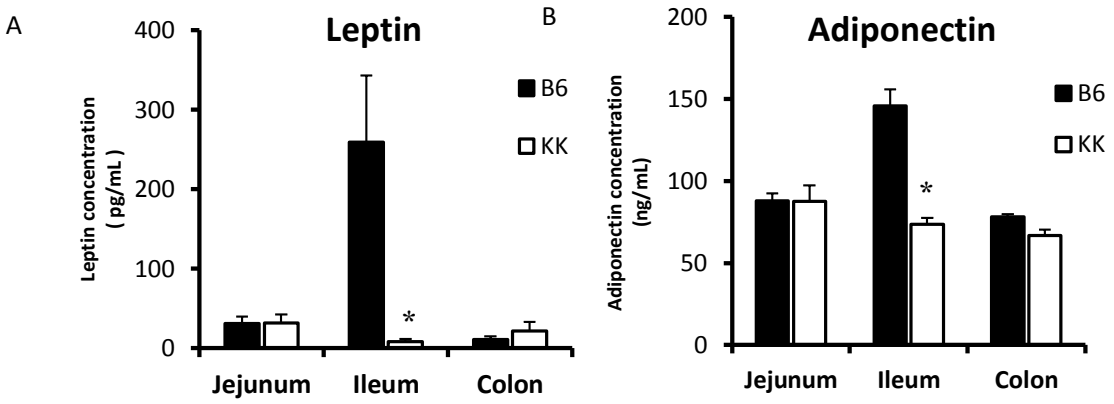

Figure 14
Effect of intestinal tissue homogenates on the secretion of adipokine by adipocytes.
3T3-L1 cells were cultured in jejunal, ileal, colonic homogenate of C57BL/6J JmsSlc (B6) and KK-Ay/TaJcl (KK) mice for 24 h. Leptin (A) and adiponectin (B) concentration in the medium was measured by ELISA. The result are expressed as the mean ± SEM of three independent experiments. Mean values with astarisks are significantly different ($p<0.05$) as estimated by Unpaired *t*-test.

Ⅳ　考察

本研究において、B6 マウスの回腸粘膜ホモジネート上清がマウス由来 3T3-L1 脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激することが明確に示された。すなわち、腸粘膜が脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激する液性因子を産生することが、*ex vivo* の実験によっても示唆された。ただし、本研究において用いたマウスの回腸粘膜ホモジネートは、上皮細胞のみに由来するものではなく、粘膜固有層に存在する線維芽細胞や免疫細胞も寄与しているので、腸上皮細胞株を用いた実験において示唆された液性因子を必ずしも反映しているとは言えない。したがって、今後の研究においては、腸粘膜から上皮細胞のみを分離し、そのものが脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激するか否かを検証することが必要である。

興味深いことに、3T3-L1 細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激したのは、回腸粘膜ホモジネート上清のみであり、空腸および結腸粘膜ホモジネート上清はそのような活性を示さなかった。この観察結果は、腸上皮細胞によるレプチン分泌がいわゆる「回腸ブレーキ」に関連することを示唆する。回腸ブレーキとは、糖質および脂質などの未消化の栄養素が遠位小腸、すなわち回腸に到達することにより、満腹感が誘導され、摂食が抑制される現象である（Maljaars *et al.* 2008）。この現象は、回腸上皮に分布する腸内分泌細胞である L 細胞が産生・分泌する消化管ホルモンであるペプチド YY（PYY）およびグルカゴン様ペプチド 1 （GLP-1）によって媒介されることが知られている（Maljaars *et al.* 2008）。すなわち、回腸に到達した栄養素が L 細胞における PYY および GLP-1 の分泌を惹起する結果、これらが迷走神経を介して満腹中枢を刺激し、満腹感を誘導する（Drucker *et al.* 2006、Maljaars *et al.* 2008）。一方、レプチンもまた強力な満腹ホルモンであるので（Campfield *et al.* 1995、Vaisse *et al.* 1996）、回腸の L 細胞から分泌される PYY および GLP-1 が脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激する結果､満腹感を誘導するという経路が主張されるかもしれない｡つまり、PYY あるいは GLP-1 こそ、本研究において示唆された腸上皮細胞が放出する液性因子であるという考えである。しかしながら、Caco-2 細胞が PYY および GLP-1 を産生・分泌するという証拠はなく、また脂肪細胞が PYY および GLP-1 の特異受容体を発現するということも報告されていない。循環血中のレプチン濃度は、絶食時に低下し、再摂食によって上昇することを考慮すると（）、本研究の観察結果は、栄養素の刺激に応答して回腸から PYY および GLP-1 以外の液性因子が放出され、そのものが脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激することを示唆する。すなわち、そのような液性因子は回腸ブレーキを媒介する新規の分子である可能性がある。

本研究において、非肥満系統である B6 マウスの回腸粘膜ホモジネート上清は 3T3-L1 脂肪細胞のレプチン分泌を刺激したが、肥満系統である KK マウスの回腸粘膜ホモジネート上清にはそのような活性がまったく認められなかった。KK マウスは多遺伝子変異に起因する過食により肥満が出現し、その後、2 型糖尿病を発症する（Kondo *et al.* 1957）。回腸粘膜由来の液性因子が脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激することにより満腹感を誘導する可能性を考慮すると、KK マウスにおいてはそのような液性因子の産生・分泌応答が欠如していることにより満腹感が誘導されず、過食を生じるのかもしれない。すなわち、KK マウスにおいて見られる過食は、回腸由来液性因子によって誘導される回腸ブレーキの欠陥によるのかもしれない。

レプチンの放出に加え、アディポネクチンの放出も B6 マウスの回腸粘膜ホモジネート上清の添加により増加した。さらに、KK マウスの回腸粘膜ホモジネート上清はレプチンと同様にアディポネクチンの放出も刺激しなかった。肥満において循環血中のアディポネクチン濃度が低下することは良く知られているが（Arita *et al.* 1999）、これには回腸における液性因子の産生・分泌の低下が少なくとも一部関与している可能性がある。

以上をまとめると、腸上皮細胞が脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激する液性因子を産生・放出することが、*ex vivo* の実験結果からも示唆された。また、このような現象の生理的意義として、この因子が回腸ブレーキを媒介する分子であると想定すれば、合理的であると考えられた。

総括

我が国における死因の第 2 位および 3 位を占める動脈硬化性疾患の強い危険因子として、メタボリックシンドロームが存在する。これは、耐糖能異常、高血圧症および脂質代謝異常が複合的に集積し、その上流に内臓脂肪蓄積型肥満が存在するという疾患概念である。従来、脂肪細胞は余剰のエネルギーを中性脂肪として蓄積するだけの受動的な役割を有するのみと考えられていたが、アディポカインと総称されるペプチド類を産生・分泌する内分泌細胞であることが知られるようになった。内臓脂肪蓄積型肥満における脂肪組織においてはマクロファージをはじめとする白血球の浸潤が認められ、そのような内臓脂肪組織の炎症状態がメタボリックシンドロームの発症・進展に寄与することも明らかになってきたが、アディポカインはそれらの一連の過程において中心的な役割を果たしている。

ところで、内臓脂肪蓄積型肥満に限らず、肥満は個体のエネルギー収支の不均衡によって体脂肪が過剰に蓄積した状態である。そのような不均衡が生じる背景には遺伝要因と環境要因が存在するが、最近の研究により、腸内細菌叢が肥満およびメタボリックシンドロームの諸症状の環境要因のひとつであることが明らかになってきた。しかしながら、腸内細菌叢がそのような疾患の発症・進展に関与する細胞・分子機序の全貌は明らかになっていない。腸内細菌が直接曝露する組織が腸上皮細胞であることを考えると、腸上皮細胞から脂肪組織へ何らかの情報が伝達され、脂肪細胞における脂肪蓄積や脂肪組織炎症に影響をおよぼす機序を想定することに不合理な点はない。実際、腸上皮細胞が産生・分泌する Fiaf/Angpt4 は脂肪細胞における脂肪蓄積の調節に関与する。このものは LPL 阻害タンパクであり、循環血中のリポタンパクから脂肪細胞への脂肪酸の取り込みを制御する機能を有するが、無菌マウスが肥満に抵抗性である理由に関して、腸上皮細胞における Fiaf/Angpt4 の高発現により LPL が阻害されることが寄与することが示された（Bäckhed *et al.* 2007）。また、やはり腸上皮細胞において産生・分泌される C 型レクチンの一種である RegⅢβが肥満発症に寄与することも報告された（Secq *et al.* 2013）。そこで本研究では、脂肪細胞の重要な機能のひとつであるアディポカインの産生・分泌の調節において腸上皮細胞が一定の役割を果たすという仮説を立て、それを明らかにするための生理学的解析を行った。

まず、ヒト初代培養脂肪細胞およびヒト脂肪細胞株 SGBS におけるレプチンおよびアディポネクチンの分泌が、ヒト小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞との非接触的共培養により増加することを示した。またこのときのレプチンの分泌増加は、翻訳前の段階で調節された結果であることが示唆された。さらに、Caco-2 細胞の CM の添加によってもヒト初代培養脂肪細胞および SGBS 細胞におけるレプチンおよびアディポネクチンの分泌が増加した。以上の結果から、腸上皮細胞は脂肪細胞におけるこれらのアディポカインの分泌を刺激する何らかの液性因子を放出するものと推察した。

腸上皮細胞に由来する脂肪細胞のレプチン分泌刺激因子について若干の検討を行った結果、そのものは分化した小腸粘膜吸収上皮細胞が放出する熱安定性の物質であり、また従来よりレプチン分泌を刺激することが知られている炎症性サイトカイン、ケモカインおよびグルコース以外のものであると考えられた。

さらに、マウスの回腸粘膜ホモジネート上清がマウス由来 3T3-L1 脂肪細胞におけるレプチンおよ

びアディポネクチン分泌を刺激することを示した。すなわち、腸粘膜が脂肪細胞におけるレプチンおよびアディポネクチン分泌を刺激する液性因子を産生することが、*ex vivo* の実験によっても示唆された。

腸上皮細胞が脂肪細胞におけるアディポカイン分泌を刺激する液性因子を放出することの生理的意義は明らかではない。しかしながら、そのような因子を放出するのが回腸のみであり、空腸および結腸からは放出されないことから、この因子がいわゆる「回腸ブレーキ」を媒介する分子であると推察した。すなわち、栄養素の刺激に応答して回腸から液性因子が放出され、そのものが脂肪細胞におけるレプチン分泌を刺激し、満腹感を誘導するという機序が存在するかもしれない。本研究においては、残念ながら、この液性因子を同定するに至らなかった。しかしながら、脂肪細胞から分泌されるレプチンは飽食シグナルを伝達するのみならずエネルギー消費を増大させること、またアディポネクチンはメタボリックシンドロームに抑制的に作用することを考慮すると、これらのアディポカインの分泌を刺激する腸上皮細胞由来の液性因子を肥満の予防・治療のための新しい標的とすることが期待できる。この液性因子は腸上皮細胞によって産生されると考えられるため、食環境によってこのものの産生・分泌を調節できる可能性がある。また、腸内細菌叢が肥満発症の環境要因となるとき、この液性因子がその細胞・分子機序の一部を担っているかもしれない。腸上皮細胞が食品成分や腸内細菌の菌体成分等を認識し、この液性因子を産生・分泌する機序を解明するためのさらなる研究が求められる。

引用文献

Ahrén B, Månsson S, Gingerich RL, Havel PJ. Regulation of plasma leptin in mice: influence of age, high-fat diet, and fasting. Am J Physiol. 1997; 273: R113-20.

Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 257 (1): 79-83.

Aruna B, Ghosh S, Singh AK, Mande SC, Srinivas V, Chauhan R, Ehtesham NZ. Human recombinant resistin protein displays a tendency to aggregate by forming intermolecular disulfide linkages. Biochemistry. 2003; 42 (36): 10554-9.

Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101 (44): 15718-23.

Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104 (3): 979-84.

Banerjee RR, Lazar MA. Dimerization of resistin and resistin-like molecules is determined by a single cysteine. J Biol Chem. 2001; 276 (28): 25970-3.

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. Mol Cell. 1999; 4 (4): 585-95.

Barbier M, Cherbut C, Aubé AC, Blottière HM, Galmiche JP. Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammationin rats. Gut. 1998; 43 (6): 783-90.

Bennett MK, Lopez JM, Sanchez HB, Osborne TF. Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways. J Biol Chem. 1995; 270 (43): 25578-83

Blaser MJ, Falkow S. What are the consequences of the disappearing human microbiota? Nat Rev Microbiol. 2009; 7 (12): 887-94.

Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I. Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1996; 81 (9): 3419-23.

Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Expression and protein kinase C-dependent regulation of peptide/H+ co-transport system in the Caco-2 human colon carcinoma cell line. Biochem J. 1994; 299 (Pt 1): 253-60.

Bruun JM, Pedersen SB, Kristensen K, Richelsen B. Effects of pro-inflammatory cytokines and chemokines on leptin production in human adipose tissue in vitro. Mol Cell Endocrinol. 2002; 190 (1-2): 91-9.

Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. Science. 1995; 269 (5223): 546-9.

Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll like receptors and NOD 2. Gut. 2005; 54 (8): 1182-93.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC, Burcelin R. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. Diabetes. 2007; 56 (7): 1761-72.

Chen J, Wang L, Boeg YS, Xia B, Wang J. Differential dimerization and association among resistin family proteins with implications for functional specificity. J Endocrinol. 2002; 175 (2): 499-504.

Creagh EM, O'Neill LA. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends Immunol. 2006; 27 (8): 352-7.

Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. Diabetologia.2006; 49 (4): 744-7.

Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, Jobin C, Lund PK. High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in mouse. PLoS One. 2010; 5 (8): e12191.

Drucker DJ. The biology of incretin hormones. Cell Metab. 2006; 3 (3): 153-65.

Fischer-Posovszky P, Newell FS, Wabitsch M, Tornqvist HE. Human SGBS cells - a unique tool for studies of human fat cell biology. Obes Facts. 2008; 1 (4): 184-9.

Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. Diabetologia.2002; 45 (9): 1201-10.

Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Leon LR, Vinson C, Reitman ML. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipoatrophic mice. J Clin Invest. 2000a; 105 (3): 271-8.

Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Graham D, Kim JK, Shulman GI, Castle AL, Vinson C, Eckhaus M, Reitman ML. Leptin and diabetes in lipoatrophic mice. Nature. 2000b; 403 (6772): 850.

Gerhardt CC, Romero IA, Cancello R, Camoin L, Strosberg AD. Chemokines control fat accumulation and leptin secretion by cultured human adipocytes. Mol Cell Endocrinol. 2001; 175 (1-2): 81-92.

Ghosh S, Singh AK, Aruna B, Mukhopadhyay S, Ehtesham NZ. The genomic organization of mouse resistin reveals major differences from the human resistin: functional implications. Gene. 2003; 305 (1): 27-34.

Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. J Clin Invest. 1996; 97 (9): 2152-7.

Hahn PF. ABOLISHMENT OF ALIMENTARY LIPEMIA FOLLOWING INJECTION OF HEPARIN. Science. 1943; 98 (2531): 19-20.

Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. Science.1995; 269 (5223): 543-6.

Hardie LJ, Rayner DV, Holmes S, Trayhurn P. Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but notZucker (fa/fa) rats as measured by ELISA. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 223 (3): 660-5.

Harris DS, Slot JW, Geuze HJ, James DE. Polarized distribution of glucose transporter isoforms in Caco-2 cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89 (16): 7556-60.

Hibuse T, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T. Aquaporins and glycerol metabolism. Biochim Biophys Acta. 2006; 1758 (8): 1004-11.

Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology. 1989; 96 (3): 736-49.

Hidalgo IJ, Borchardt RT. Transport of bile acids in a human intestinal epithelial cell line, Caco-2. Biochim Biophys Acta. 1990; 1035 (1): 97-103.

Hidalgo IJ, Borchardt RT. Transport of a large neutral amino acid (phenylalanine) in a human intestinal epithelial cell line: Caco-2. Biochim Biophys Acta.1990; 1028 (1): 25-30.

Hirsch J, Knittle JL, and Salans LB. Cell lipid content and cell number in obese and nonobese human adipose tissue. J Clin Invest. 1966; 45 (6): 1023-37.

Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, Baker TW, Gurney A, Henzel W, Nelson C, Lowman HB, Wright BD, Skelton NJ, Frantz GD, Tumas DB, Peale FV Jr, Shelton DL, Hébert CC. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. EMBO J. 2000; 19 (15): 4046-55.

Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. Science. 2001; 292 (5519): 1115-8.

Hosoda K, Masuzaki H, Ogawa Y, Miyawaki T, Hiraoka J, Hanaoka I, Yasuno A, Nomura T, Fujisawa Y, Yoshimasa Y, Nishi S, Yamori Y, Nakao K. Development of radioimmunoassay for human leptin. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 221 (2): 234-9.

Iovanna JL, Dagorn JC. The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linkedto a short N-terminal peptide. Biochim Biophys Acta. 2005; 1723 (1-3): 8-18.

Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M. Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. Nature. 2003; 422 (6928): 173-6.

Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. J Lipid Res. 1972; 13 (1): 2-11.

Kadowaki T. Insights into insulin resistance and type 2 diabetes from knockout mouse models. J Clin Invest. 2000; 106 (4): 459-65.

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. Endocr Rev. 2005; 26 (3): 439-51.

Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. J Clin Invest. 2006; 16 (7): 1784-92.

Kawabe Y, Sato R, Matsumoto A, Honda M, Wada Y, Yazaki Y, Endo A, Takano T, Itakura H, Kodama T. Regulation of fatty acid synthase expression by cholesterol in human cultured cells. Biochem Biophys Res Commun. 1996; 219 (2): 515-20.

Kawai T, Akira S. TLR signaling. Semin Immunol. 2007; 19 (1): 24-32.

Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1953; 140 (901): 578-96.

Kondo K, Nozawa K, Tomita T, Ezaki K. Inbred strains resulting from Japanese mice. Bull Exp Animal. 1957; 6: 107-12.

Kubota N, Terauchi Y, Miki H, Tamemoto H, Yamauchi T, Komeda K, Satoh S, Nakano R, Ishii C, Sugiyama T, Eto K, Tsubamoto Y, Okuno A, Murakami K, Sekihara H, Hasegawa G, Naito M, Toyoshima Y, Tanaka S, Shiota K, Kitamura T, Fujita T, Ezaki O, Aizawa S, Kadowaki T, et al. PPAR gamma mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. Mol Cell. 1999; 4 (4): 597-609.

Kubota T, Kubota N, Moroi M, Terauchi Y, Kobayashi T, Kamata K, Suzuki R, Tobe K, Namiki A, Aizawa S, Nagai R, Kadowaki T, Yamaguchi T. Lack of insulin receptor substrate-2 causes progressive neointima formation in response to vessel injury. Circulation. 2003; 107 (24): 3073-80.

Lazar MA. The humoral side of insulin resistance. Nat Med. 2006; 12 (1): 43-4.

Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature. 1996; 379 (6566): 632-5.

Lee JJ, Smith PJ, Fried SK. Mechanisms of decreased lipoprotein lipase activity in adipocytes of starved rats depend on duration of starvation. J Nutr. 1998; 128 (6): 940-6.

Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? Science. 2010; 330 (6012): 1768-73.

Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102 (31): 11070-5.

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell. 2006a; 124 (4): 837-48.

Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 2006b; 444 (7122): 1022-3.

Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. Lancet. 2002; 360 (9326): 57-8.

Lopez JM, Bennett MK, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF. Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93 (3): 1049-53.

Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). Biochem Biophys Res Commun.1996; 221 (2): 286-9.

Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. J Biol Chem. 2003; 278 (41): 40352-63.

Maljaars PW, Peters HP, Mela DJ, Masclee AA. Ileal brake: a sensible food target for appetite control. A review. Physiol Behav. 2008; 95 (3): 271-81.

Masuzaki H, Ogawa Y, Isse N, Satoh N, Okazaki T, Shigemoto M, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Yoshimasa Y, et al. Human obese gene expression. Adipocyte-specific expression and regional differences in the adipose tissue. Diabetes. 1995; 44 (7): 855-8.

Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. Ann N Y Acad Sci. 1999; 892: 146-54.

Moon B, Kwan JJ, Duddy N, Sweeney G, Begum N. Resistin inhibits glucose uptake in L6 cells independently of changes in insulin signaling and GLUT4 translocation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003; 285 (1): E106-15.

Mueller WM, Gregoire FM, Stanhope KL, Mobbs CV, Mizuno TM, Warden CH, Stern JS, Havel PJ. Evidence that glucose metabolism regulates leptin secretion from cultured rat adipocytes. Endocrinology. 1998; 139 (2): 551-8.

Murakami T, Iida M, Shima K. Dexamethasone regulates obese expression in isolated rat adipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1995; 214 (3): 1260-7.

Nagaev I, Smith U. Insulin resistance and type 2 diabetes are not related to resistin expression in human fat cells or skeletal muscle. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 285 (2): 561-4.

Nagaev I, Bokarewa M, Tarkowski A, Smith U. Human resistin is a systemic immune-derived proinflammatory cytokine targeting both leukocytes and adipocytes. PLoS One. 2006; 1: e31.

Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. Gastroenterology. 2009; 136 (1): 65-80.

Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K, Akanuma Y, Fujiwara T, Horikoshi H, Yazaki Y, Kadowaki T. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. Clin Invest. 1998; 101 (6): 1354-61.

Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/ adiponectin. Implications fpr metabolic regulation and bioactivity. J Biol Chem. 2003; 278 (11): 9073-85.

Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C, Macphee CH, Smith SA. Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. Biochem Biophys Res Commun. 2003; 300 (2): 472-6.

Raghu P, Ghosh S, Soundarya K, Haseeb A, Aruna B, Ehtesham NZ. Dimerization of human recombinant resistin involves covalent and noncovalent interactions. Biochem Biophys Res Commun. 2004; 313 (3): 642-6.

Rangwala SM, Rich AS, Rhoades B, Shapiro JS, Obici S, Rossetti L, Lazar MA. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. Diabetes. 2004; 53 (8): 1937-41.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes.1988; 37 (12): 1595-607.

Reiser R, Bryson MJ, Carr MJ, Kuiken KA. The intestinal absorption of triglycerides. J Biol Chem. 1952; 194 (1): 131-8.

Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. Mol Cell. 1999; 4 (4): 611-7.

Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. Biochimie. 1986; 68 (9): 1035-40.

Sánchez L, Ismail M, Liew FY, Brock JH. Iron transport across Caco-2 cell monolayers. Effect of transferrin, lactoferrin and nitric oxide. Biochim Biophys Acta. 1996; 1289 (2): 291-7.

Sarraf P, Frederich RC, Turner EM, Ma G, Jaskowiak NT, Rivet DJ 3rd, Flier JS, Lowell BB, Fraker DL, Alexander HR. Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role ininflammatory anorexia. J Exp Med. 1997; 185 (1): 171-5.

Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A, Considine RV, O'Rahilly S. Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. Diabetes. 2001; 50 (10): 2199-202.

Secq V, Mallmann C, Gironella M, Lopez B, Closa D, Garcia S, Christa L, Montalto G, Dusetti N, Iovanna JL. PAP/HIP protein is an obesogenic factor. J Cell Physiol. 2014; 229 (2): 225-31.

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. Nature. 1999; 401 (6748): 73-6.

Sidler D, Renzulli P, Schnoz C, Berger B, Schneider-Jakob S, Flück C, Inderbitzin D, Corazza N, Candinas D, Brunner T. Colon cancer cells produce immunoregulatory glucocorticoids. Oncogene. 2011; 30 (21): 2411-9.

Simons PJ, van den Pangaart PS, van Roomen CP, Aerts JM, Boon L. Cytokine-mediated modulation of leptin and adiponectin secretion during in vitro adipogenesis: evidence that tumor necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-treated human preadipocytes are potent leptin producers. Cytokine. 2005; 32 (2): 94-103.

Slack E, Hapfelmeier S, Stecher B, Velykoredko Y, Stoel M, Lawson MA, Geuking MB, Beutler B, Tedder TF, Hardt WD, Bercik P, Verdu EF, McCoy KD, Macpherson AJ. Innate and adaptive immunity cooperate flexibly to maintain host-microbiota mutualism. Science. 2009; 325 (5940): 617-20.

Smith SJ, Cases S, Jensen DR, Chen HC, Sande E, Tow B, Sanan DA, Raber J, Eckel RH, Farese RV Jr. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. Nat Genet. 2000; 25 (1): 87-90.

Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY, Enders GH, Silberg D G, Wen X, Wu GD, Lazar MA. A family of tissue-specific resistin-like molecules. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001a; 98 (2): 502-6.

Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature. 2001b; 409 (6818): 307-12.

Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Yun K. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. Differentiation. 1986; 31 (1): 42-9.

Sugihara H, Yonemitsu N, Miyabara S, Toda S. Proliferation of unilocular fat cells in the primary culture. J Lipid Res. 1987; 28 (9): 1038-45.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell. 1995; 83 (7): 1263-71.

Tilg H, Moschen AR, Kaser A. Obesity and the microbiota. Gastroenterology. 2009; 136 (5): 1476-83.

Traber MG, Kayden HJ, Rindler MJ. Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line. J Lipid Res. 1987; 28 (11): 1350-63.

Tsao TS, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Lodish HF. Oligomerization state-dependent activation of NF-kappa B signaling pathway by adipocyte complement-related protein of 30 kDa (Acrp30). J Biol Chem. 2002; 277 (33): 29359-62.

Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y,Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. J Biol Chem. 2004; 279 (29): 30817-22.

Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, Kadowaki T. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison ofactivation of PPAR alpha, PPAR gamma, and their combination. Diabetes. 2005; 54 (12): 3358-70.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006; 444 (7122): 1027-31.

Turnbaugh PJ, Bäckhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. Cell Host Microbe. 2008; 3 (4): 213-23.

Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. Nat Genet. 1996; 14 (1): 95-7.

van Deventer SJ. Review article: Chemokine production by intestinal epithelial cells: a therapeutic target in inflammatory bowel disease? Aliment Phermacol Ther. 1997

Wabitsch M, Jensen PB, Blum WF, Christoffersen CT, Englaro P, Heinze E, Rascher W, Teller W, Tornqvist H, Hauner H. Insulin and cortisol promote leptin production in cultured human fat cells. Diabetes. 1996; 45 (10): 1435-8.

Wabitsch M, Brenner RE, Melzner I, Braun M, Möller P, Heinze E, Debatin KM, Hauner H. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. Int J Obes Relat Metab Disord. 2001; 25 (1): 8-15.

Weigle DS, Duell PB, Connor WE, Steiner RA, Soules MR, Kuijper JL. Effect of fasting, refeeding, and dietary fat restriction on plasma leptin levels. J Clin Endocrinol Metab. 1997; 82 (2): 561-5.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. J Clin Invest. 2003; 112 (12): 1796-808.

Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. J Clin Invest. 2003; 112 (12): 1785-8.

Wellhoener P, Fruehwald-Schultes B, Kern W, Dantz D, Kerner W, Born J, Fehm HL, Peters A. Glucose metabolism rather than insulin is a main determinant of leptin secretion in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2000; 85 (3): 1267-71.

Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, McKeon C, Darlington GJ, Spiegelman BM. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. Mol Cell. 1999; 3 (2): 151-8.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. J Clin Invest. 2003; 112 (12): 1821-30.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O,Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. Nat Med. 2001; 7 (8): 941-6.

Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. Nature. 2003; 423 (6941): 762-9.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 1994; 372 (6505): 425-32.

厚生労働省 平成22年度人口動態統計結果の概要

厚生労働省　健康日本21

厚生労働省　特定健康診査・特定保健指導

杉原　甫　脂肪細胞の増殖第 124回日本医学会シンポジウム記録0集 肥満の科学 2004; 71-81.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、数々の御助言、御指導を賜りました農学研究院 応用生命科学部門 食品科学分野 食品機能化学研究室 園山 慶准教授に厚く御礼申し上げます。また、同研究室 川端 潤教授、加藤 英介助教、鶴田 剛司前特任助教、吉田 綾子元特任助教には、懇切丁寧な御指導を賜りましたことを心より感謝申し上げます。 学位論文作成にあたり、多くの御助言を賜りました生命科学院 環境応答統御科学分野 分子生物学研究室 内藤 哲教授、先端生命科学研究院 細胞生物科学分野 自然免疫研究室 綾部 時芳教授には、心より感謝申し上げます。

本研究に際し、快く細胞株を御提供くださいましたUlm大学Martin Wabitsch教授に深く感謝いたします。

博士課程在学中において、研究を進めていく上で大きな励みとなった同期の浅野 真未さんに心より感謝申し上げます。また、細胞実験を行う上で多くの御指導をいただきました同期の長坂 悠生さんに深謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、水野 祐希さん、三輪 明穂さん、濱田 晃弘さん他、食品機能化学研究室の皆様、同研究室の卒業生の熱心な協力を得たことを記すとともに、心より感謝申し上げます。

最後に、長い学生生活を支援し、励まし続けてくれた両親、祖母、そして友人に心より感謝いたします。

2015 年 6 月